

F. J. Schott

Freiburg im Br. 1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Isolierung spezifischer tRNAs
und Bestimmung thermodynamischer Parameter
mit physikalisch-chemischen Methoden

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i.Br.



vorgelegt von
Franz-Joachim Schott
aus Tuttlingen

Winter-Semester 1978/79



1.1. Die Prüfungsausschüsse

- 1.1.1. Die Prüfungsausschüsse der Fakultäten
- 1.1.2. Die Prüfungsausschüsse der Fachbereiche
- 1.1.3. Die Prüfungsausschüsse der Studiengänge
- 1.1.4. Die Prüfungsausschüsse der Studiengänge

1.2. Die Prüfungsausschüsse

- 1.2.1. Die Prüfungsausschüsse
- 1.2.2. Die Prüfungsausschüsse
- 1.2.3. Die Prüfungsausschüsse

1.3. Die Prüfungsausschüsse

- 1.3.1. Die Prüfungsausschüsse
- 1.3.1.1. Die Prüfungsausschüsse
- 1.3.1.2. Die Prüfungsausschüsse
- 1.3.1.3. Die Prüfungsausschüsse
- 1.3.1.4. Die Prüfungsausschüsse

Dekan: Professor Dr. Horst Rimpler
Leiter der Arbeit: Professor Dr. Theodor Ackermann
Referent: Professor Dr. Theodor Ackermann
Korreferent: Professor Dr. Herbert Zimmermann

Tag der Verkündung des Prüfungsergebnisses:

- 1.4. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.1. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.2. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.3. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.4. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.5. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.6. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.7. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.8. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.9. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.10. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.11. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.12. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.13. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.14. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.15. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.16. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.17. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.18. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.19. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.20. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.21. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.22. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.23. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.24. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.25. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.26. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.27. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.28. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.29. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.30. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.31. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.32. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.33. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.34. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.35. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.36. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.37. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.38. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.39. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.40. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.41. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.42. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.43. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.44. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.45. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.46. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.47. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.48. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.49. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.50. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.51. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.52. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.53. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.54. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.55. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.56. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.57. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.58. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.59. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.60. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.61. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.62. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.63. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.64. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.65. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.66. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.67. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.68. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.69. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.70. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.71. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.72. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.73. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.74. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.75. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.76. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.77. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.78. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.79. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.80. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.81. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.82. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.83. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.84. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.85. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.86. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.87. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.88. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.89. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.90. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.91. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.92. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.93. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.94. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.95. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.96. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.97. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.98. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.99. Die Prüfungsausschüsse
- 1.4.100. Die Prüfungsausschüsse

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	<u>Einleitung und Problemstellung</u>	1
1.1.	Über tRNA und ihre Funktion	1
1.2.	Über die Struktur von tRNA	4
1.3.	Über die Bestimmung der "Schmelzenthalpie" von tRNA	7
1.4.	Aufgabenstellung	13
2.	<u>Materialien und Methoden</u>	14
2.1.	Materialien	14
2.2.	Organismus	15
2.3.	Methoden	16
2.3.1.	Konzentrationsbestimmung der tRNA	16
2.3.1.1.	Konzentrationsbestimmung mit Hilfe der Phosphatanalyse	16
2.3.1.2.	Direkte optische Konzentrations- bestimmung der tRNA	19
2.3.1.3.	Konzentrationsbestimmung im Verlauf einer Säulenchromatographie	20
2.3.2.	Bestimmung der Reinheit von für eine Aminosäure spezifischer tRNA	20
2.3.2.1.	Bestimmung der Reinheit über den Einbau von radioaktiven Aminosäuren	20
2.3.2.2.	Berechnung der spezifischen Reinheit der tRNA	21
2.3.3.	Bestimmung des Bruchteils der tRNA-Moleküle mit fehlendem CCA ^{OH} -Ende	22
2.3.3.1.	Bestimmung über den Einbau von radioaktivem ATP	22
2.3.3.2.	Über die Änderung der Beladbarkeit von tRNA	23
2.3.4.	Bestimmung der Proteinkonzentration	23
2.3.4.1.	Proteinbestimmung mit der Biuretmethode	23
2.3.4.2.	Optische Methode	23
2.3.5.	Isolierung der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen	24
2.3.5.1.	1. Schritt - Herstellen eines zell- freien Extraktes	24
2.3.5.2.	2. Schritt - Fraktionierte Ammonium- sulfatfällung	24

2.3.5.3.	3. Schritt - DEAE-Cellulose-Chromatographie	25
2.3.6.	Isolierung der tRNA-Nukleotidyltransferase	25
2.3.6.1.	1. Schritt - Herstellen eines zellfreien Extraktes	25
2.3.6.2.	2. Schritt - Polymin-Fällung	26
2.3.6.3.	3. Schritt - Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	26
2.3.6.4.	4. Schritt - CM-Sephadex C50 Chromatographie	26
2.3.6.5.	5. Schritt - Aussalzen an Sepharose 4B	27
2.3.7.	Isolierung von spezifischer tRNA	28
2.3.7.1.	Lyophilisieren von tRNA-Lösungen	28
2.3.7.2.	Einbau von CMP und AMP in das 3'Ende der tRNA und Beladung der tRNA mit Aminosäure	28
2.3.7.3.	Abtrennung von Protein aus der tRNA-Lösung	29
2.3.7.4.	Chromatographie an benzoyleierter-DEAE-Cellulose als 1. Reinigungsschritt	30
2.3.7.5.	Modifikation der spezifisch beladenen tRNA als Reinigungsschritt	30
2.3.7.6.	Reversed-Phase-Chromatographie (RPC)	31
2.3.7.8.	Chromatographie an DEAE-Sephadex-Gel als letzter Reinigungsschritt zur Isolierung von tRNA ^{Phe}	32
2.3.7.9.	Chromatographie an BD-Cellulose zur Trennung von tRNA ₁ ^{Lys} und tRNA ₂ ^{Lys}	33
2.3.7.10	Isolierung von tRNA ₁ ^{Val} aus Bäckerhefe	33
2.4.	Beschreibung der physikalisch-chemischen Meßverfahren	34
2.4.1.	Optische Messungen zur Untersuchung des Helix-Coil-Überganges von tRNA	34
2.4.2.	Kalorimetrische Messungen	35
2.4.2.1.	Beschreibung des verwendeten adiabatischen Mikrokalorimeters	35
2.4.2.2.	Probenvorbereitung	37
2.4.2.3.	Durchführung der kalorimetrischen Messungen	38

2.4.2.4.	Auswertung der kalorimetrischen Messungen	39
3.	<u>Ergebnisse und Diskussion</u>	40
3.1.	Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und Nukleotidyltransferase	40
3.1.1.	Zur Funktion der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen	40
3.1.2.	Zur Anreicherung der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen spezifisch für Lysin, Valin und Phenylalanin	41
3.1.3.	Zur Funktion der Nukleotidyltransferase	41
3.1.4.	Zur Anreicherung der Nukleotidyltransferase	43
3.2.	Zur Isolierung spezifischer tRNA	43
3.2.1.	Diskussion von in der Literatur beschriebenen Reinigungsverfahren	43
3.2.2.	Zur Verwendung von BD-Cellulose-, Reversed-Phase-Chromatographie und einer Modifikation von beladener tRNA für die Isolierung spezifischer tRNA	45
3.2.3.	Zur Isolierung von tRNA ^{Phe} und tRNA ^{Lys}	48
3.2.3.1.	BD-Cellulose-Chromatographie als erster Reinigungsschritt	48
3.2.3.2.	Isolierung von tRNA ^{Phe} mit DEAE-Sephadex-Chromatographie	49
3.2.3.3.	Weitere Anreicherung der tRNA ^{Lys} durch Modifikation der beladenen tRNA	49
3.2.3.4.	Zuordnung der beiden Lysin-spezifischen isoakzeptierenden tRNAs	52
3.2.3.5.	Trennung der isoakzeptierenden tRNAs mit Reversed-Phase-Chromatographie	52
3.2.3.6.	Isolierung von tRNA ^{Val} ₁ aus Bäckerhefe	58
3.3.	Reinheit der isolierten tRNA	59
3.4.	Optische Messungen zur Untersuchung des Helix-Coil-Überganges von tRNA	60
3.4.1.	Bestimmung der Umwandlungsenthalpie nach van't Hoff	60
3.5.	Kalorimetrische Untersuchung des Helix-Knäuel-Übergangs von tRNA	63
3.5.1.	Wahl der geeigneten Versuchsbedingungen	63

3.5.2. Präzision der durchgeführten kalorimetrischen Messungen	64
3.6. Ergebnisse der kalorimetrischen Messungen	66
3.6.1. Kalorimetrische Messungen an tRNA ^{Phe} aus Hefe	66
3.6.2. Kalorimetrische Messungen an tRNA ₁ ^{Val} aus Hefe	71
3.6.3. Kalorimetrische Messungen an tRNA ₁ ^{Val} aus E.coli	73
3.6.4. Kalorimetrische Messungen an tRNA ^{Lys} aus Hefe	75
3.6.5. Kalorimetrische Messungen an tRNA ^{Tyr} aus E.coli	77
3.6.6. Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der kalorimetrischen Messungen	79
3.7. Diskussion der Ergebnisse	80
3.7.1. Zur tRNA ^{Phe} aus Hefe	80
3.7.2. Zur tRNA ₁ ^{Val} aus Hefe	82
3.7.3. Zur tRNA ₁ ^{Val} aus E.coli	83
3.7.4. Zur tRNA ^{Lys} aus Hefe	84
3.7.5. Zur tRNA ^{Tyr} aus E.coli	85
3.8. Diskussion der Aussagen aus den kalorimetrischen Messungen zur Struktur der tRNA	86
4. <u>Zusammenfassung</u>	94
5. <u>Literaturverzeichnis</u>	97

Abkürzungsverzeichnis und Nomenklatur der Enzyme

A	Adenosin
AA-tRNA	mit Aminosäure beladene tRNA
Aminoacyl-Synthetase	Aminoacyl-tRNA-Synthetase; Aminosäure: tRNA Ligase (AMP)
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
C	Cytidin
CI	Curie
CTP	Cytidin-5'-Triphosphat
DEAC-	Diäthylaminoäthyl-
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
E.C.	Enzym-Katalog
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EFG	Elongationsfaktor G
EFT	Elongationsfaktor T
G	Guanosin
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
Nukleotidyltransferase	ATP,CTP:tRNA Nukleotidyltrans- ferase E.C.2.7.7.25
Lysin-tRNA-Synthetase	L-Lysin:tRNA Ligase(AMP) E.C.6.1.1.6.
OD	optische Dichte
Phenylalanin-tRNA- Synthetase	L-Phenylalanin:tRNA Ligase(AMP) E.C.6.1.1.20
Poly A:U	Beispiel einer Doppelhelix gebildet aus Poly A und Poly U (andere Nukleotide analog)
POPOP	2,2'-p-Phenylen-bis-(4-methyl- 5-phenyloxazol)
PPi	Pyrophosphat
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNA	Ribonukleinsäure
T	Thymin
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
THF	Tetrahydrofuran
Valin-tRNA Synthetase	L-Valin:tRNA Ligase (AMP) E.C.6.1.1.9.

U

Unit: ist die Enzymmenge,
die unter den Bedingungen
des Testes die Umsetzung
von 1 mol Substrat in einer
Minute bei 30 C bewirkt.
(1U = 16.67 nkat)

U

Uridin

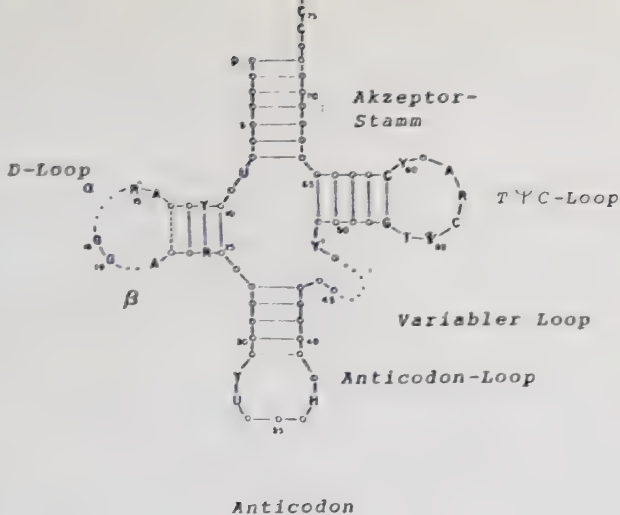
Einleitung und Problemstellung

Über tRNA und ihre Funktion

Die zum korrekten biochemischen Aufbau der Proteine -d.h.: zur Verknüpfung der Aminosäurereste in der richtigen Reihenfolge- notwendige Information ist in der Nukleotidsequenz der DNA niedergelegt. Bei der Umsetzung des Informationsgehaltes der DNA wird zunächst die Information durch Synthese einer zur DNA komplementären Messenger-RNA (mRNA) auf diese übertragen (Transskription). Die Nukleotidsequenz der mRNA wird dann über einen Tripletcode (Codon siehe Abb. 1) in die Aminosäuresequenz der Proteine übertragen (Translation). Da eine direkte Wechselwirkung der Aminosäure mit der mRNA aus chemischen Gründen zu unspezifisch ist, geschieht das Abgreifen der mRNA-Matrize nicht durch die Aminosäure selbst, sondern mit Hilfe der tRNA ("Adaptor-Hypothese", Crick (1955)).

Außer an der Proteinbiosynthese ist die tRNA z.B. auch an der Regulation der Biosynthese von Aminosäuren und als Primer an der DNA-Synthese aus Virus-RNA beteiligt. Auch wird vermutet, daß tRNA eine wichtige Rolle bei der Zelldifferentiation und bei Krebs spielt.

1965 ist es Holley (Holley et al. 1965) als Erstem gelungen, die Primärstruktur der für die Aminosäure Alanin spezifischen tRNA aus Hefe ($tRNA_{Hefe}^{Ala}$) zu bestimmen. Durch Rückfaltung des Moleküls in sich selbst können sich Basenpaarungen analog der Basenpaarungen der DNA (Watson und Crick) bilden. Eine maximale Anzahl von Basenpaaren ergibt sich, wenn man, wie Holley für die $tRNA^{Ala}$ vorgeschlagen hat, das tRNA-Molekül in einer kleeblattähnlichen Struktur anordnet (siehe Abb. 1). Mit dieser Anordnung ergibt sich auch für alle anderen bisher sequenzierten tRNA-Moleküle eine maximale Anzahl Basenpaare und damit eine Sekundärstruktur mit maximaler Stabilität. Außerdem gibt die Faltung auch eine gewisse Stabilität gegenüber dem Abbau durch Nukleasen. Das Kleeblatt ergibt sich auch als die wahrscheinlichste Anordnung (Eigen 1973; Eigen und Winkler 1975), wenn die Nukleinsäuresequenz der Ribonukleinsäuren



Anticodon

Abb. 1:

Kleeblattstruktur nach Holley (1965) für alle tRNAs außer der Initiator-tRNA

tRNA besteht aus 73 bis 93 Nukleosiden (Rich und Schimmel 1977): hauptsächlich Adenosin (A), Cytidin (C), Guanosin (G), Uridin (U), die über Phosphatester der 3' und 5' OH-Gruppen der Ribose verknüpft sind. Daneben kommen noch einige für RNA ungewöhnliche Nukleoside vor wie Thymidin (T), Dihydrouridin (D), Pseudouridin (Y) und andere meist methylierte Derivate der üblichen Nukleoside A, C, G und U. R steht für Purine und Y für Pyrimidine. Die mit α und β bezeichneten Gebiete und der variable Loop enthalten je nach tRNA eine verschiedene Anzahl von Nukleotiden. Nach der Anzahl (n) der Basenpaare im D-Stamm und der Anzahl (m) der Nukleotide im variablen Loop werden die tRNAs in Klassen mit der Bezeichnung $D_n V_m$ eingeteilt.

Wenn durch Rückfaltung des Nukleotidstranges eine Folge sich gegenüberliegender zueinander komplementären Basen G und C bzw. A und U entsteht, kann sich durch Knüpfung von H-Brücken eine Doppelhelix analog der DNA (Watson und Crick 1953) ausbilden. Die so erhaltene Anordnung des Polynukleotids wird als Sekundärstruktur bezeichnet.

durch den Zufall bestimmt ist, wie dies für die ersten tRNA-Moleküle, die ja die ersten Makromoleküle mit Reproduktionsfähigkeit gewesen sein sollen (Eigen 1976), zutrifft.

Für jede Aminosäure gibt es mindestens eine meistens mehrere spezifische tRNAs (isoakzeptierende tRNAs), die bei der Biosynthese entweder durch verschiedene DNA-Sequenzen codiert werden oder sich bei gleicher Codierung durch Modifikation (meist Methylierung) an mehreren Basen unterscheiden.

Mit Hilfe der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (offizieller Name: Aminosäure: tRNA-Ligasen) werden die Aminosäuren als Ester am C-3' bzw. C-2' mit anschließender Umlagerung an das C-3' (Sprinzl et al. 1973, Sprinzl und Cramer 1973) des endständigen Adenosins der tRNA gebunden ("tRNA-Beladung"). Dazu muß die tRNA eine intakte C-C-A-Sequenz an der 3'terminalen Gruppierung haben, die, falls nur teilweise vorhanden, durch die Nukleotidyltransferase (offizieller Name: ATP,CTP:tRNA Nukleotidyltransferase) repariert werden kann.

Im weiteren Verlauf der Proteinbiosynthese kann ein Fehler durch Verknüpfen einer tRNA mit einer nicht entsprechenden Aminosäure nicht mehr rückgängig gemacht werden. Die beladene tRNA (Aminoacyl-tRNA, AA-tRNA) bildet einen Komplex mit dem Elongationsfaktor T (EFT) und GTP, der dann vom Ribosom an der A-site (Stelle für die AA-tRNA) gebunden wird. Dort tritt das Anticodon (siehe Abb. 1) mit der mRNA in Wechselwirkung. Das Anticodon besteht aus einer Sequenz von drei Basen, die im tRNA Molekül an exponierter Stelle angeordnet sind. Theoretisch lassen sich bei vier verschiedenen Basen 64 solcher Triplets bilden, so kann es 64 tRNA's mit verschiedenem Anticodon geben. Ist nun an der A-site eine tRNA mit zur mRNA komplementärem Basentriplett gebunden, bildet sich ein Komplex mit dem Elongationsfaktor G (EFG), und die tRNA wird in die P-site (Peptidyl-site) gebracht, wo die mit der tRNA verknüpfte Aminosäure an die zu synthetisierende Peptidkette geknüpft wird.

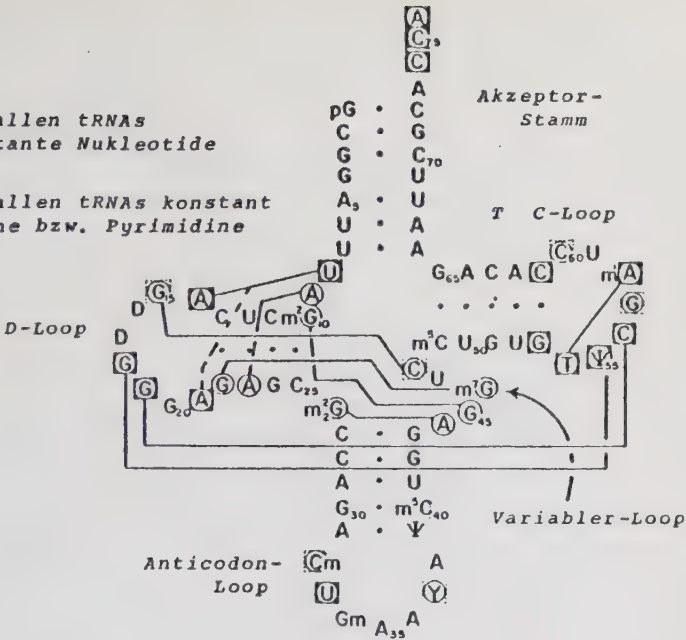
2. Über die Struktur von tRNA

Entsprechend der von Holley postulierten Kleeblattstruktur lassen sich die in den Loops (siehe Abb. 1) auftretenden Esterbindungen leichter als die entsprechenden Bindungen in den gepaarten Helixabschnitten durch Nukleasen spalten (Zachau et al. 1966). Ähnliche Ergebnisse erhält man für die N-Oxydierbarkeit (Cramer et al 1968). Differenzierte "Schmelzkurven" (Römer et al. 1970 und kalorimetrische Untersuchungen an tRNA (Privalov et al 1975, Hinz et al. 1976, Hinz et al. 1977, Privalov und Filimanov 1978) zeigen das getrennte "Schmelzen" von mehreren Helixbereichen.

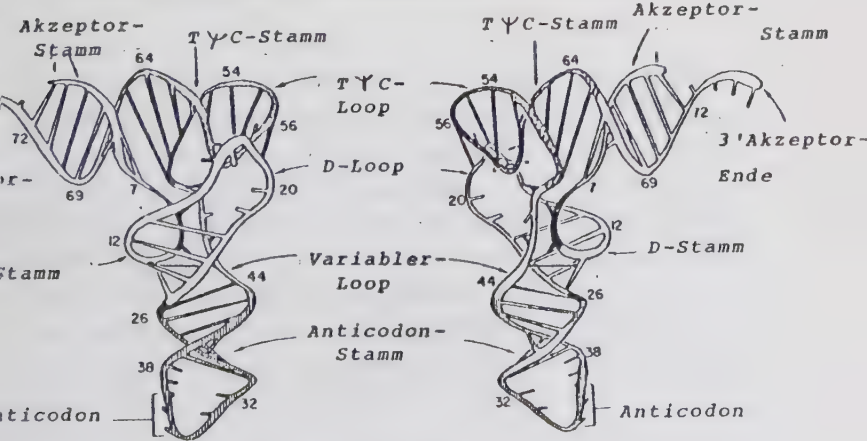
Neben der durch das Kleeblattmodell postulierten Sekundärstruktur gibt es auch Hinweise auf eine zusätzliche Tertiärstruktur. Dies ergeben Untersuchungen über die Hypochromizität der tRNA-Lösungen im UV-Bereich (Fresco et al. 1966),, sowie über Circular dichroismus (Brahms et al. 1964), optische Rotationsdispersion (Fasman et al. 1965), IR (Tsuboi et al. 1969) und über die Beladungsreaktion (Levitt 1969, Schmidt et al. 1970, Schmidt und Reid 1971, Cramer und Reid 1971). Die Annahme der Existenz einer Tertiärsstruktur wird auch gestützt durch Bindungsexperimente mit Trinukleotiden und tRNA^{Phe} (Pongs et al. 1971), wobei sich neben den helikalen Bereichen des Kleeblattmodells auch Teile des Dihydrou-racilloops (vergl. Abb. 1) einer Assoziation mit den komplementären Trinukleotiden entziehen, wie es zu erwarten ist, wenn dieser Bereich in einer Tertiärstruktur involviert ist. Die Röntgen-Kristallstrukturanalyse (Kim et al. 1974, Robertus et al. 1974, Quigley et al. 1975) bestätigt das Vorhandensein einer Tertiärstruktur (siehe Abb. 2). Auch für die tRNA in Lösung weisen Ergebnisse von NMR-Untersuchungen (Wong et al. 1972, Reid et al. 1975, Reid und Robillard 1975) auf eine Tertiärstruktur, die mit der Struktur im Kristall identisch ist, hin (Sussmann und Kim 1975, Robillard et al. 1976, Robillard et al. 1977).

Abb. 2:

- Bei allen tRNAs konstante Nukleotide
- Bei allen tRNAs konstant Purine bzw. Pyrimidine



a) Anordnung der tRNA^{Phe} nach dem Kleeblattmodell.
Die in der Tertiärstruktur gefundenen zusätzlichen H-Brücken sind durch Verbindungslinien angedeutet.



b) Dreidimensionale Struktur der tRNA^{Phe}
(Vorder- und Rückseite)

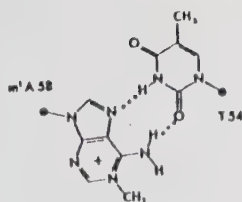
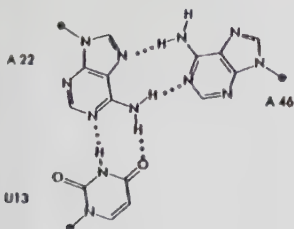
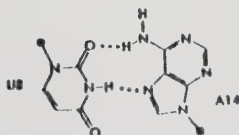
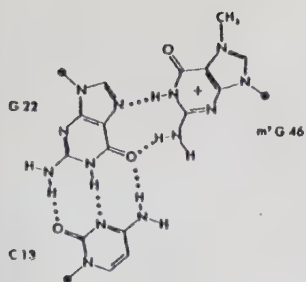


Abb. 2c: Beispiele von H-Brücken zwischen Basen, die in der Tertiärstruktur gefunden werden. (Die Zahlen entsprechen der Numerierung der Basen im Kleeblattmodell)

Zu Abb. 2

Die durch Röntgenstrukturanalyse gefundene Tertiärstruktur zeigt ein L-förmiges Gebilde. An einem Ende des "L's" ist der Anticodon-Loop, während sich am anderen der Akzeptor-Stamm befindet. Der D- und der TYC-Loop bilden das Eck des "L's". Es ergeben sich aus den vier Armen des Kleeblatts zwei durchgehende Bereiche, die in einem Winkel von 45° zueinander stehen und so die L-förmige Struktur ergeben (siehe Abb. 2b).

Der Anticodon-Loop bildet sehr wenig tertiäre H-Brücken aus, so daß er relativ leicht beweglich und leicht zugänglich ist.

Die Röntgenstrukturanalyse ist geeignet, den festen kristallinen Zustand zu untersuchen. Da die meisten biochemischen Prozesse sich in wässrigen Lösungen abspielen, gilt das besondere Interesse den Strikturen im gelösten Zustand. Deshalb sind alle physikalischen Meßverfahren, die eine zusätzliche Information über die Struktur in Lösung geben, von großem Nutzen. Neben den spektroskopischen Methoden besteht die Möglichkeit zu prüfen, ob thermodynamische Daten im Einklang mit den postulierten Modellen für die Struktur von Biomolekülen stehen, und damit kann eine Aussage über die Richtigkeit der Annahme gemacht werden.

Über die Bestimmung der "Schmelzenthalpie"^x von tRNA

Während in der letzten Zeit große Fortschritte bei der Untersuchung der Tertiärstruktur von tRNA (vergl. 1.2.) und beim Studium der Kinetik des Auffaltens der geordneten tRNA zum statistischen Knäuel (Römer et al. 1969, Römer et al. 1970, Coutts et al. 1975) gemacht wurden, gibt es noch immer eine große Unsicherheit darüber, wie groß die Energiewerte für die Stabilisierung der Struktur sind. Zur Bestimmung von thermodynamischen Daten sind als Modelle für doppelsträngige RNA Polynukleotide aus einfachen sich wiederholenden Basensequenzen (poly A:U, poly AU:AU, poly C:C, poly GC:GC, poly GU:G) verwendet worden. Auch aus Untersuchungen mit Oligonukleotiden, die ähnliche Strukturen, wie sie in natürlich vorkommenden RNA- und tRNA-Molekülen vorhanden sind, aufweisen, konnten thermodynamische Daten gewonnen werden.

Die Werte sind indirekt über optische Umwandlungskurven meist durch Anwendung des aus der chemischen Gleichgewichtslehre bekannten Modells eines "Alles oder Nichts"-Prozesses bestimmt worden.

Thermodynamische Daten von gelösten Biomolekülen lassen sich direkt mit Hilfe der Mikrokalorimetrie (vgl. z.B. Ackermann 1977), einer hierfür sehr nützlichen und einzigartigen Methode gewinnen.

^x Die für das Auffalten der geordneten tRNA-Struktur zum statistischen Knäuel benötigte Energie wird in der biochemischen Literatur oft als "Schmelzenthalpie" bezeichnet.

So ist poly A:U durch kalorimetrische Messungen in mehreren Arbeitsgruppen ausführlich untersucht worden. Mit verschiedenen Puffern und Salzkonzentrationen sind Umwandlungsenthalpien von 18,9 bis 41,2 kJ pro Mol Basenpaar gemessen worden (Sturtevant 1954, Steiner und Kitzinger 1962, Krakauer und Sturtevant 1968, Neumann und Ackermann 1967, 1969, Klump 1972, Filimonov und Privalov 1978). Durch Untersuchung des sich selbst komplementären Oligonukleotids A_7U_7 sind 29,8 kJ pro Mol Basenpaar bestimmt worden (Breslauer et al. 1975), während mit UV-Spektroskopie an A_nU_n je nach Auswertungsverfahren eine Umwandlungsenthalpie von 23,1 bzw. 31,9 kJ pro Mol A:U Basenpaar erhalten worden ist.

Eine interessante Anwendung der gesammelten thermodynamischen Daten von Oligonukleotiden besteht bei entsprechender systematischer Zuordnung in der Möglichkeit, allein aus der Primärstruktur eines RNA-Moleküls die stabilste Sekundärstruktur zu bestimmen und anzugeben wie groß die Stabilisierungsenergie ist.

Da mit der Mikrokalorimetrie die thermodynamischen Parameter direkt bestimmt werden, kann überprüft werden, inwieweit die hauptsächlich aus optischen Messungen erhaltenen Werte für Oligonukleotide sich auf größere Moleküle wie tRNA übertragen lassen, und ob es damit möglich ist, Aussagen über die Struktur von RNA-Molekülen in Lösung zu machen.

Für $tRNA_{Hefe}^{Phe}$ ist unter der Annahme eines "Alles oder Nichts"-Prozesses eine "Schmelzenthalpie" nach van't Hoff von 777 kJ/mol (D.Bode, Dissertation, 1973) gefunden worden, während durch Spalten der tRNA und Untersuchung der einzelnen Molekülstücke ein Wert von 619 kJ/mol (Römer et al. 1969) gemessen worden ist. Für $tRNA^{Ala}$ haben Riesner und Mitarbeiter (Riesner et al. 1969, Riesner et al. 1970) im Mg^{2+} Ionen-freien Medium eine weitgehende Trennung der Schmelzvorgänge der verschiedenen Helixbereiche erreicht und durch Summieren der einzelnen van't Hoff-Enthalpien einen Wert von 680 kJ/mol berechnet.

Bei Messungen mit dem isothermen Mischungskalorimeter sind für die $tRNA_{Hefe}^{Phe}$ 680 kJ/mol (Levy et al. 1972) und 1218 kJ/mol (D.Bode, Dissertation, 1973) gefunden worden.

Durch Experimente mit dem adiabatischen Mikrokalorimeter sind folgende Werte gemessen worden:

tRNA ^{Asp} _{Hefe}	1300 - 1350 kJ/mol (Privalov & Filimonov 1978)
tRNA ^{Ile} _{Hefe}	1339 kJ/mol (Hinz et al. 1976)
tRNA ^{fMet} _{E.coli}	1360 - 1402 kJ/mol (Privalov & Filimonov 1978)
tRNA ^{Phe} _{Hefe}	590 - 1090 kJ/mol (Brandts et al. 1974)
tRNA ^{Phe} _{Hefe}	1004 kJ/mol (Bode et al. 1974)
tRNA ^{Phe} _{Hefe}	1025 - 1050 kJ/mol (Freire & Biltonen 1978)
tRNA ^{Phe} _{Hefe}	1247 kJ/mol (Hinz et al. 1977)
tRNA ^{Ser₂} _{Hefe}	1339 kJ/mol (Hinz et al. 1976)
tRNA ^{Val₁} _{Hefe}	1554 kJ/mol (Privalov et al. 1975)
tRNA ^{Val₁} _{Hefe}	1393 kJ/mol (Hinz et al. 1977)

Als Ursache für die unterschiedlichen Werte kommen die verschiedene Präzision und das Auflösungsvermögen der Kalorimeter, die Reinheit der Proben und vor allem die Konzentrationsbestimmung der tRNA in Betracht.

Hinz und Privalov haben die Konzentration der tRNA direkt durch Extinktionsmessungen im UV bestimmt, wobei die Extinktionskoeffizienten durch Vergleich mit Messungen der Beladbarkeit (vgl. 2.3.2.1.) der tRNA oder durch Aufsummieren der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Basen mit Berücksichtigung der Hypochromizität berechneten.

Dagegen hat Bode die Konzentration über eine Phosphatanalyse, deren Fehler kleiner als der durch die Meßgenauigkeit des Kalorimeters bedingte Fehler ist, bestimmt.

Für tRNA sollte es möglich sein zu entscheiden, ob die über Mikrokalorimetrie bestimmte Umwandlungsenthalpie

den Basenpaaren der durch das Kleeblattmodell postulierten Sekundärstruktur entspricht oder ob noch zusätzliche Wechselwirkungen eine Tertiärstruktur stabilisieren.

Bode (Bode et al. 1974) hat die für tRNA^{Phe} gemessene Umwandlungsenthalpie von 1004 kJ/mol den durch das Kleeblattmodell postulierten 20 Basenpaare zugeordnet, während Hinz (Hinz et al. 1976, 1977) für tRNAs mit unterschiedlicher Anzahl an Basenpaaren im Rahmen der Meßgenauigkeit die gleiche Umwandlungsenthalpie erhalten hat.

Unter der Annahme, daß das Auffalten der tRNA sich durch mehrere voneinander unabhängige "Alles oder Nichts"-Prozesse beschreiben läßt, haben Privalov und Filimonov (1978) die durch kalorimetrische Untersuchungen erhaltenen Meßkurven als Summe der Beiträge mehrerer unabhängig voneinander schmelzender Molekülbereiche berechnet. Sie konnten so der Sekundärstruktur in den verschiedenen Molekülbereichen der tRNA und der Tertiärstruktur Umwandlungsenthalpien zuordnen.

In Abb. 3 sind die Umwandlungsenthalpien der in der Arbeit von Privalov und Filimonov (1978) diskutierten sechs verschiedenen tRNAs in einem Diagramm gegen die durch das Kleeblattmodell postulierte Anzahl von H-Brücken aufgetragen. Es ist keine deutliche Abhängigkeit der Umwandlungsenthalpien von der H-Brücken-Anzahl festzustellen. Als Erklärung für das Abweichen der H-Werte für tRNA^{Val} könnte eine von der Struktur der anderen tRNAs abweichende Tertiärstruktur postuliert werden. Die für tRNA^{Val} bestimmte Umwandlungsenthalpie wurde zunächst mit 1554 kJ/mol (Privalov et al. 1975) angegeben. Für die optische Konzentrationsbestimmung wurde der Extinktionskoeffizient für tRNA^{Val} aus den Extinktionskoeffizienten der in tRNA enthaltenen Basen unter Berücksichtigung eines abgeschätzten Wertes für die Hypochromizität errechnet. Nach Neuberechnung des Extinktionskoeffizienten ist in einer späteren Arbeit (Privalov und Filimonov 1978) 1298 - 1398 kJ/mol für

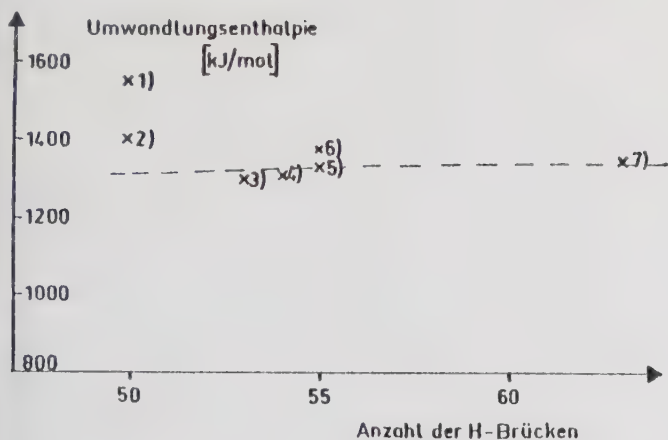


Abb. 3:

Die Umwandlungsenthalpien der von Privalov und Filimonov (1978) untersuchten tRNAs sind in Abhängigkeit von der Anzahl der H-Brücken in der Sekundärstruktur aufgezeichnet.

1) und 2) $tRNA_1^{Val}$ aus Hefe

3) $tRNA^{Phe}$ aus Hefe

4) $tRNA_1^{Ile}$ aus Hefe

5) $tRNA^{Asp}$ aus Hefe

6) $tRNA^{fMet}$ aus E.coli

7) $tRNA_1^{Ser}$ aus Hefe

tRNA^{Val} angegeben worden. Wegen dieser Unsicherheit in der zur Messung der Umwandlungsenthalpie notwendigen Konzentrationsbestimmung kann der Wert für tRNA^{Val} nicht unbedingt mit den Umwandlungsenthalpien der anderen tRNAs verglichen werden.

Aufgabenstellung

Um den Zusammenhang zwischen der durch das Kleeblattmodell für die Sekundärstruktur von tRNA postulierten Anzahl von H-Brücken und der Umwandlungsenthalpie näher zu untersuchen, ergibt sich als Ziel für diese Arbeit: Es sollten tRNAs mit unterschiedlicher Primärstruktur isoliert werden, um deren Umwandlungsenthalpien zu messen.

Wegen der in der Literatur existierenden Unsicherheiten der Umwandlungsenthalpien von tRNA^{Phe} und tRNA^{Val}₁ (jeweils aus Hefe) sollten diese Werte neu gemessen werden.

Da tRNA^{Ser} als einzige der bisher kalorimetrisch untersuchten tRNAs einen ausgedehnten extra Loop besitzt und eine im Vergleich zur H-Brückenzahl kleine Umwandlungsenthalpie hat, sollte eine weitere tRNA mit ausgedehntem extra Loop kalorimetrisch untersucht werden.

Dabei muß beachtet werden, daß die zu untersuchenden Proben sehr rein sind und eine möglichst genaue Konzentrationsbestimmung ausgeführt wird.

Materialien und Methoden

Materialien

$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	p.a.	E.Merck, Darmstadt
EDTA	p.a.	E.Merck, Darmstadt
HCL (konz.)	p.a.	E.Merck, Darmstadt
H_2SO_4 (konz.)	p.a.	E.Merck, Darmstadt
K-Acetat	p.a.	E.Merck, Darmstadt
K-Na-Tartrat	p.a.	E.Merck, Darmstadt
KCl	p.a.	E.Merck, Darmstadt
KH_2PO_4 (nach Soerensen)	p.a.	E.Merck, Darmstadt
KJ	p.a.	E.Merck, Darmstadt
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	p.a.	E.Merck, Darmstadt
Na-Acetat	p.a.	E.Merck, Darmstadt
NA-Citrat	p.a.	E.Merck, Darmstadt
NaCl	p.a.	E.Merck, Darmstadt
NaH_2PO_4	p.a.	E.Merck, Darmstadt
Na_2HPO_4	p.a.	E.Merck, Darmstadt
NaOH	p.a.	E.Merck, Darmstadt
Na_2SO_4	p.a.	E.Merck, Darmstadt
Adogen 464		Oleochim, Brüssel
ATP	p.a.	Boehringer, Mannheim
BD-Cellulose		Serva, Heidelberg Boehringer, Mannheim
CTP	p.a.	Boehringer, Mannheim
DEAE-Cellulose		Serva, Heidelberg
Dithiotreitol (threo 1,4-Dimercapto-2,4-butandiol)		EGA Chemie, Steinheim
DMF		E.Merck, Darmstadt
Essigsäure	p.a.	E.Merck, Darmstadt
Glycerin		E.Merck, Darmstadt
GTP		Boehringer, Mannheim

Hefe		Pleser bezogen über Bäko, Freiburg
Hydraziniumsulfat	p.a.	E.Merck, Darmstadt
L-Lysin	p.a.	E.Merck, Darmstadt
¹⁴ C-L-Lysin		Amersham Buchler, Braunschweig
2-Mercaptoäthanol		Fluka, Buchs/Schweiz
(2-Naphtoxy)-Essigsäure- N-hydroxysuccinimidester		EGA Chemie, Steinheim
Natriummolybdat	p.a.	E.Merck, Darmstadt
L-Phenylalanin		E.Merck, Darmstadt
¹⁴ C-L-Phenylalanin		Amersham Buchler, Braunschweig NEN, Dreieich
Phenylmethansulfonsäure- fluorid		E.Merck, Darmstadt
Plaskon CTFE Pulver		Allied Chemical Corp., Morristown/New Jersey/USA
Polymin P		BASF, Ludwigshafen
POPOP		E.Merck, Darmstadt
PPO		E.Merck, Darmstadt
Rinderserumalbumin		Serva, Heidelberg
tRNA-Gemisch aus Bäckerhefe		Boehringer, Mannheim
tRNA ^{Phe} aus Bierhefe		Boehringer, Mannheim
tRNA ^{Val} aus E.coli		Boehringer, Mannheim
Sephadex-Gele		Pharmacia, Uppsala/Schw.
THF	p.a.	E.Merck, Darmstadt
Triäthanolaminhydrochlorid	p.a.	E.Merck, Darmstadt
Tris	p.a.	E.Merck, Darmstadt
L-Valin		E.Merck, Darmstadt
¹⁴ C-L-Valin		Schwarz Man, Orangeburg, New York/USA Amersham Buchler Braunschweig

Organismus

Zur Isolierung der einzelnen spezifischen tRNAs wurde ein Gemisch der tRNAs aus Bäckerhefe verwendet, das von der Firma Boehringer bezogen wurde.

Die Aminoacyl-tRNA Synthetasen und die Nukleotidyltransferase wurden aus Bäckerhefe der Firma Pleser isoliert.

3. Methoden

1. Konzentrationsbestimmung der tRNA

Bei den untersuchten Proben konnte die Konzentration an tRNA nicht ohne weiteres aus der Einwaage bestimmt werden, da das lyophilisierte Material wechselnde Mengen an Wasser und Salzen enthielt.

1. Konzentrationsbestimmung mit Hilfe der Phosphatanalyse

Benötigte Lösungen:

- 1.) Standardphosphatlösung (1 ml = 0,05 mg P)
219,7 mg KH_2PO_4 in 1 l H_2O
- 2.) Natriumsulfitlösung (15%)
15 g Na_2SO_3 in 100 ml H_2O
- 3.) Molybdatlösung
12,5 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in 500 ml 10 n H_2SO_4
- 4.) Hydrazinsulfatlösung
1,5 g $\text{H}_2\text{NNH}_2 \times \text{H}_2\text{SO}_4$ in 1 l H_2O
- 5.) Perchlorsäure (70%)

Durchführung:

a) für Proben mit weniger als 0,02 mg P

Die Proben wurden mit Einwegspritzen in gebogene Reagenzgläser mit einer Eichmarke bei 10 ml und bekanntem Gewicht eingefüllt. Die Probenmenge wurde durch Differenzwägung der Spritze bestimmt. Danach wurden jeweils 0,3 ml Perchlorsäure zugesetzt und die Reagenzgläser 20 Minuten bei 200 °C in einem Aluminiumheizblock (Firma mgw Lauda) erhitzt. Dabei wurden die organischen Bestandteile oxidiert. Nach Abkühlen der Probe wurden 0,8 ml Natriumsulfitlösung zugesetzt und kurz erwärmt. Dadurch wurde die überschüssige Perchlorsäure reduziert (Hague und Bright 1941). Nach Zugabe von 1 ml Molybdatlösung und 0,4 ml Hydrazinsulfatlösung wurde mit H_2O bis zur 10 ml Eichmarke aufgefüllt, durch Schütteln gemischt und die Reagenzgläser 10 Minuten in ein siedendes Wasserbad gestellt. Danach wurde die Probe sofort im Eisbad abgekühlt. Durch Wägung kontrolliert wurde die Probe in den Reagenzgläsern mit H_2O auf ein Gesamtvolumen von 11 ml ($\approx$ 11 g) aufgefüllt.

b) für Proben bis 0,1 mg P

Es wurde analog verfahren wie unter a) beschrieben. Allerdings wurden die Bestimmungen in 50 ml Reagenzgläsern durchgeführt, wobei 1 ml Perchlorsäure und 3 ml Natriumsulfitlösung verwendet wurden. Vor Zugabe der Molybdatlösung (5 ml) und Hydrazinsulfatlösung (2 ml) wurde der Inhalt der Reagenzgläser quantitativ in 50 ml Meßkolben überführt und mit H_2O bis zur Eichmarke aufgefüllt. Nach dem Erhitzen im Wasserbad und Abkühlen im Eisbad wurde das Volumen korrigiert.

Die Extinktion der durch sechs- und vierwertige Mischoxide des Molybdäns blaugefärbten Lösung wurde bei 830 nm und 660 nm gemessen. Die Extinktionsmessungen bei 830 nm wurden an einem Spektralphotometer der Firma Zeiss, Modell PM QII, in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke, die Messungen bei 660 nm an einem Spektralphotometer der Firma Pye Unicam, Modell SP 1800, in Küvetten mit 3 cm Schichtdicke durchgeführt.

Bestimmung des Phosphorgehaltes

Mit der Standardphosphatlösung wurde für beide Wellenlängen eine Eichgerade aufgenommen und deren Geradengleichung durch lineare Regression ermittelt (siehe Abb. 4).

Bei 880 nm:

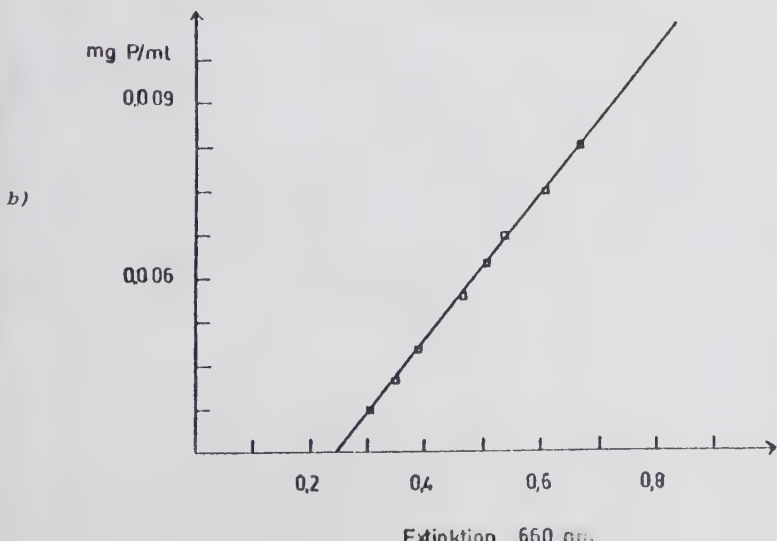
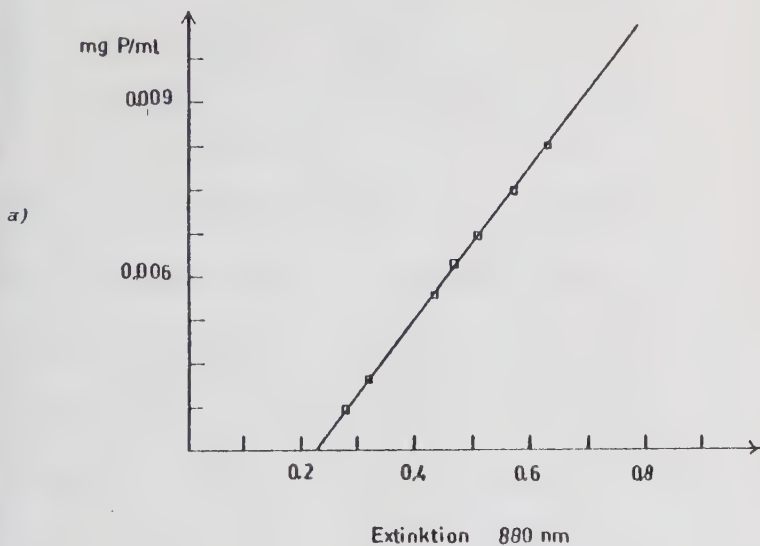
$$\text{mg P/ml} = 0,01356 \times E_{880} + 0,00006$$

Bei 660 nm:

$$\text{mg P/ml} = 0,01251 \times E_{660} - 0,00006$$

Abb. 4:

Zur Erstellung einer Eichgeraden für die Phosphatbestimmung ist die Extinktion bei a) 880 nm und bei b) 660 nm in Abhängigkeit des in der Probe vorhandenen Phosphors mg P/ml aufgetragen.



Berechnung der Molarität der tRNA-Lösung

Die Molarität der tRNA Lösung läßt sich aus der gemessenen Phosphormenge nach folgender Formel berechnen:

$$\text{tRNA (mol/ml)} = \frac{P [\text{g}]}{V_p [\text{ml}] \cdot \text{MG}_{\text{Ph}} [\text{g/mol}] \cdot \text{ME}}$$

P = für die Probe gemessene Menge Phosphor [g]

V_p = Volumen der Probe [ml]

MG_{Ph} = Atomgewicht des Phosphors 30,974 [g/mol]

ME = Anzahl der monomeren Einheiten der tRNA

tRNA^{Phe} aus Bäckerhefe: 76 monomere Einheiten

tRNA^{Lys}₁ aus Bäckerhefe: 76 monomere Einheiten

tRNA^{Lys}₂ aus Bäckerhefe: 76 monomere Einheiten

tRNA^{Tyr}₁ aus E.coli: 85 monomere Einheiten

tRNA^{Val}₁ aus E.coli: 76 monomere Einheiten

tRNA^{Val}₁ aus Bäckerhefe: 77 monomere Einheiten

Direkte optische Konzentrationsbestimmung der tRNA

Zur Bestimmung der Konzentration wurde die Extinktion der tRNA in 0,1 M NaCl Lösung pH 7,0 bei 260 nm und 20°C gemessen. Dazu wurde ein Hitachi 124 Spektralphotometer verwendet, das mit einem thermostatisierten Küvettenhalter ausgerüstet war. Eine optische Dichte-Einheit (OD₂₆₀) entspricht der Menge tRNA, die in 1 ml gelöst in einer Küvette mit 1 cm Schichtdicke bei 260 nm gemessen die Extinktion 1 ergibt.

Konzentrationsbestimmung im Verlauf einer Säulen- chromatographie

Die relativen tRNA Konzentrationen im Eluat während einer Chromatographie wurden durch Messung der Extinktion bei 254 nm mit einem Durchflußphotometer (Uvicord II LKB-Produkter, Uppsala/Schweden) bestimmt.

Bestimmung der Reinheit von für eine Aminosäure spezifischer tRNA

Bestimmung der Reinheit über den Einbau von radioaktiven Aminosäuren

Modifiziert nach Zachau (1973)

Testprinzip:



Meßbedingungen:

Es wurde die durch TCA fällbare Radioaktivität mit einem Tricarb Szintillationszähler (Firma Packard) gemessen.

Testansatz für die Bestimmung von tRNA^{Lys}, tRNA^{Phe}
und tRNA^{Val}

Konzentration im Test

0,05 ml Kalium-Cacodylatpuffer

(150 mM, pH 7,4)

75 mM

0,01 ml MgCl₂ (100 mM)

10 mM

0,01 ml ATP (10 mg/ml)

1 mg/ml

0,01 ml tRNA Probe

0,01 ml ¹⁴C-Aminosäure

(ca. 1 n Mol, ca. 1 n Ci) ca. 10 μ M

0,01 ml Aminoacyl-Synthetase (Die Konzentration wurde so gewählt, daß die tRNA innerhalb von 10 Minuten vollständig beladen wurde)

Nach Zugabe der Aminoacyl-Synthetase wurde die Probe auf einem Whirlmix (Firma Cenco, Niederlande) durchmischt und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. 0,05 ml der Probe

wurden in ein Reagenzglas mit 5 ml eisgekühlter TCA (7%ig) gegeben. Der Niederschlag wurde auf einer Millipore Fritte mit einem GF/C filter (firma Whatman) abfiltriert und dreimal mit 5 ml eisgekühlter TCA (7%ig) gespült. Das Filter wurde in ein 20 ml Plastikfläschchen gegeben und mit 5 ml einer Szintillationslösung (0,7 g PPO, 5 mg PUPOP, 5 g Naphtalin in 100 ml Dioxan gelöst) versetzt und im Szintillationszähler gezählt.

Berechnung der spezifischen Reinheit der tRNA

Die Reinheit der tRNA wird angegeben in pMol einbaubare Aminosäure pro OD₂₆₀ tRNA.

Die Molmenge der spezifischen tRNA errechnet sich nach der allgemeinen Formel

$$\text{tRNA [pMol]} = \frac{R \text{ [cpm]} - R_0 \text{ [cpm]}}{S \text{ [cpm/pMol]}}$$

R = gemessene Radioaktivität der Probe [cpm]

R₀ = gemessene Radioaktivität einer Probe, die keine tRNA enthält [cpm]

S = Spezifität der radioaktiven Aminosäure [cpm/pMol]

Da die Zählausbeute durch verschiedene Faktoren wie z.B. Geometrie des Probengefäßes, Optimierung des Gerätes, Szintillationslösung beeinflusst wird, wurde durch eine Eichmessung die Zählausbeute einer Probe mit bekannter Radioaktivität unter Bedingungen des Tests bestimmt. Pro 1 n Ci ergab sich eine Zählausbeute von 17 000 cpm. Mit dieser Zählausbeute ergaben sich für die verwendeten Aminosäuren folgende Spezifitäten:

^{14}C -L-Lysin (Amersham Buchler)	150 mCi/nMol $\hat{=}$ 267 cpm/pMol
^{14}C -L-Valin (Amersham Buchler)	125 mCi/nMol $\hat{=}$ 222 cpm/pMol
^{14}C -L-Valin (Schwarz Man)	50 mCi/nMol $\hat{=}$ 89 cpm/pMol
^{14}C -L-Phenylalanin (NEN)	460 mCi/nMol $\hat{=}$ 819 cpm/pMol
^{14}C -L-Phenylalanin (Amersh.B.)	225 mCi/nMol $\hat{=}$ 400 cpm/pMol

3. Bestimmung des Bruchteils der tRNA-Moleküle mit fehlendem CCA^{OH}-Ende

1. Bestimmung über den Einbau von radioaktivem ATP

Testprinzip:



Testansatz:

Lösung I

0,15 ml H_2O
 0,12 ml Tris (1M, pH 9,5)
 0,04 ml KCl (1M)
 0,01 ml MgCl_2 (1M)

Lösung II

0,1 ml ATP (5 mM)
 0,01 ml CTP (30 mM)
 0,05 ml H_2O

Konzentration im Test

0,02 ml Lösung I 125 mM Tris/HCl, 42 mM KCl, 10 mM MgCl_2
 0,01 ml Lösung II 0,5 mM ATP, 0,3 mM CTP
 0,01 ml H_2O
 0,01 ml tRNA Probe
 0,01 ml Nukleotidyltransferase (die Konzentration wurde so gewählt, daß nach 10 Minuten Inkubation kein weiterer Einbau von ATP erfolgte)

Nach Zugabe der Nukleotidyltransferase wurde die Probe auf einem Whirlmix (Firma Cenco, Niederlande) durchmischt und im Wasserbad bei 30°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Probe mit TCA gefällt und weiter verarbeitet wie unter 2.3.1.2. beschrieben. Die Berechnung der Menge an eingebaute ATP erfolgte analog wie unter 2.3.1.2. beschrieben. Die radioaktive Spezifität des verwendeten C^{14} -ATP (Amersham Buchler) war 1,78 cpm/pMol.

2. Über die Änderung der Beladbarkeit von tRNA

Die Beladungsreaktion wurde wie unter 2.3.2.1. beschrieben durchgeführt, aber vor Zugabe der Aminoacyl-tRNA-Synthetase wurden 0,01 ml CTP (0,15 mg/ml) hinzugefügt und dann mit soviel Nukleotidyltransferase 10 Minuten lang inkubiert, daß eine vollständige Regenerierung der CCA-Sequenz erfolgen konnte. Anschließend wurde die tRNA mit Hilfe der Aminoacyl-Synthetase beladen und die Beladbarkeit mit einer Probe verglichen, die nicht mit Nukleotidyltransferase inkubiert wurde.

4. Bestimmung der Proteinkonzentration

1. Proteinbestimmung mit der Biuretmethode

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Beisenherz et al. (1953) durchgeführt und die Lösungen entsprechend hergestellt. Um das Protein von Verunreinigungen, welche bei der Bestimmung stören, abzutrennen, wurde es ausgefällt. Dazu wurden 0,2 ml ICA (3 M) zu 0,1 ml Proteinlösung in 1 ml H₂O gegeben. Das ausgefällte Protein wurde mit einer Tischzentrifuge (Firma Dupont, Sorvall GLC 2B) 10 Minuten bei 5 000 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 2,5 ml H₂O suspendiert. 2,5 ml Biuretlösung wurden hinzugegeben und unter gelegentlichem Schütteln 30 Minuten stehengelassen. Zur Bestimmung des Blindwertes wurden 2,5 ml H₂O und 2,5 ml Biuretreagenz zusammengegeben.

Berechnung der Proteinkonzentration

mg Protein/ml Lösung = $(E - E_{\text{Blind.}}) \times \text{Faktor.}$

Der Faktor wurde mit Rinderserumalbumin als Eichprotein zu 195 bestimmt (Meßstrahlung: $\lambda = 546 \text{ nm}$)

2. Optische Methode

Die relativen Proteinkonzentrationen im Eluat während der Säulenchromatographien wurden durch Messung der Extinktion bei 285 nm mit einem Durchflußphotometer (Uvicord II LKB - Producter, Uppsala/Schweden) bestimmt.

5. Isolierung der tRNA-Aminoacyl-Synthetasen

1. 1. Schritt - Herstellen eines zellfreien Extraktes

500 g Bäckerhefe (Pleser) wurden mit einem elektrischen Handrührgerät zerkleinert und mit 150 ml 60°C heißem Toluol vermengt. Das überschüssige Toluol wurde abgepreßt und die Hefe in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt bis sie unter Gasen flüssig wurde. Danach wurden 200 ml 100 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,2, 1 mM EDTA) zugegeben und 1,5 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, wobei der pH mit NH_3 (10%ig) auf 7,2 konstant gehalten wurde. Die Suspension wurde mit einer Zentrifuge (Sorvall) 60 Minuten bei 4°C und 20 000 g zentrifugiert. Zum Überstand wurden 20% des Volumens Streptomycinsulfat (20%ig, pH 7,2) zugetropft, wobei der pH auf 7,2 konstant gehalten wurde. Anschließend wurde die Lösung noch 15 Minuten unter Eiskühlung gerührt und dann 45 Minuten bei 4°C und 20 000 g zentrifugiert.

2. 2. Schritt - Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Zum zellfreien Extrakt wurde Gluthation in 2,5 M Tris/HCl pH 7,0 gelöst zugegeben, bis eine Konzentration von 600 mg Gluthation pro Liter erreicht war. Unter Konstanthaltung des pH auf 7,2 mit NH_3 (10%ig) wurden 263 g Ammoniumsulfat pro Liter zugegeben. Die Suspension wurde 15 Minuten gerührt und dann 45 Minuten bei 4°C und 20 000 g zentrifugiert. Das abzentrifugierte Protein wurde verworfen. Bei der anschließenden zweiten Ammoniumsulfatfällung wurden pro Liter Lösung 230 g Ammoniumsulfat zugesetzt. Über Nacht wurde die Suspension bei 4°C aufbewahrt und dann 45 Minuten bei 4°C und 20 000 g zentrifugiert.

Der Niederschlag wurde in 50 ml Puffer A (20 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 7,5, 20 mM 2-Mercaptoäthanol, 1 mM EDTA) gelöst. Diese Lösung (100 ml) wurde zur Entfernung von Proteinbruchstücken und Aminosäuren über eine Sephadex G 25-Säule (Gelbett Ø 5 cm, Höhe 80 cm) auf Puffer A equilibriert. Dabei wurde die aufgegebene Lösung auf ungefähr das doppelte Volumen verdünnt.

3.3. 3. Schritt - DEAE-Cellulose-Chromatographie

Die verwendete Säule hatte einen Durchmesser von 5 cm und das Gelbett war 30 cm hoch. Die DEAE-Cellulose wurde mit drei Säulenvolumen Puffer A gespült und dann wurden 200 ml der Proteinlösung mit Hilfe einer Schlauchpumpe (100 ml/h) aufgegeben. Um die Aminoacyl-Synthetasen abzulösen, wurde mit einem Gradientenmischer (Dialagrad, Firma Isco) aus Puffer A und Puffer B (250 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 6,5, 20 mM 2-Mercaptoäthanol, 1 mM EDTA) eine Lösung mit steigendem Anteil an Puffer B über die Säule gepumpt. Einstellung des Gradientenmischers: Programmdauer 24 Std, Durchflußrate 160 ml/h, Stufen des Gradienten: 0%, 8 %, 16%, 24%, 32%, 40%, 50%, 65%, 80%, 100%. 100 % Puffer B. Die Fraktionen mit Aktivität der Aminoacyl-Synthetasen wurden vereinigt und mit 550 g Ammoniumsulfat pro Liter gefällt und abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in wenig 50 mM Tris/HCl Puffer (pH 7,2, 1 mM EDTA, 5% Glyzerin) gelöst und gegen den gleichen Puffer, der aber 50% Glyzerin enthielt, dialysiert. Diese Enzymlösung wurde bei -20°C aufbewahrt.

3.6. Isolierung der tRNA - Nukleotidyltransferase

3.1. 1. Schritt - Herstellung eines zellfreien Extraktes

3 kg tiefgefrorene Hefe wurden mit 1 l Puffer (0,1 M Tris/ NH_3 pH 9,0, 300 mM NH_4Cl , 20 mM MgSO_4 , 1 mM EDTA und 30 g Glukose pro Liter) übergossen und ca. 20 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Während dieser Zeit fing die Hefesuspension an, leicht zu fermentieren. Direkt vor dem Aufschluß (2-malige Passage durch eine Manton-Gaulin-Pressen bei 60 MPa) wurde 0,5 ml Silikonöl-Antischaum zugegeben. Das Homogenat wurde gleich nach dem Aufschluß 60 Minuten bei 20 000 g zentrifugiert. Diese und alle weiteren Operationen wurden bei 4°C ausgeführt.

2. 2. Schritt - Polymin-Fällung

Pro kg Hefe wurden in den Überstand des Homogenats 4 g Polymin tropfenweise zugegeben. Das Polymin wurde zuvor mit dem 2-3fachen Volumen H_2O versetzt und 24 Stunden gegen H_2O dialysiert. Nach der Dialyse wurde das Polymin mit HCl auf pH 7 gebracht und so unter Konstanthalten des pH eingetropft. Nach 10 Minuten Rühren wurde der entstandene Niederschlag während 45 Minuten bei 20 000 g abzentrifugiert. Der hier erhaltene klare Überstand diente der anschließenden fraktionierten Ammoniumsulfatfällung.

3. 3. Schritt - Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Zu dem Überstand der Polyminfällung wurden 200 g Ammoniumsulfat pro Liter unter Rühren und Konstanthalten des pH auf 7,3 zugegeben. Anschließend wurde noch 30 Minuten weitergerührt und dann der entstandene Niederschlag während 45 Minuten bei 20 000 g abzentrifugiert und verworfen. Dann wurde der Überstand der 1. Fällung mit weiteren 220 g Ammoniumsulfat pro Liter versetzt und wie oben abzentrifugiert. Der Niederschlag der 2. Fällung wurde in wenig Puffer A (30 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 7,1, 0,5 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 0,01 mM Phenylmethylsulfonsäurefluorid und 5 Vol% Glyzerin) gelöst, und diese Lösung während 10-15 Stunden gegen Puffer A dialysiert.

4. 4. Schritt - CM-Sephadex C50 Chromatographie

Das Dialysat des gelösten Ammoniumsulfat-Niederschlags (ca. 300 ml) wurde 1:1 mit Puffer A verdünnt und auf eine CM-Sephadexsäule (ca. 500 ml Bettvolumen, Ø 5 cm, Durchflußgeschwindigkeit 80 ml/h) aufgebracht. Das Sephadex-Gel wurde vorher ausreichend mit Puffer A equilibriert. Das Eluat hatte gleichen pH und gleiche Leitfähigkeit wie Puffer A. Nach dem Einlaufen des verdünnten Dialysates wurde die Säule mit Puffer A, der 50 mM an KCl war (pH 7,1), absorptionsfrei gewaschen.

Anschließend wurde die Enzymaktivität mit Puffer A, der 200 mM an KCl war (pH 7,1), eluiert. Die aktiven Fraktionen dieser Chromatographie wurden vereinigt.

5. Schritt - Aussalzen an Sepharose 4B

Eine Säule ($\emptyset$ 3 cm, ca. 25 cm Länge, Durchflußgeschwindigkeit 80 ml/h) wurde mit Sepharose 4B gefüllt. Anschließend wurde die Säule mit einer 70% (450 g pro Liter) Ammoniumsulfat gesättigten Lösung in Puffer A gewaschen (ca. 500 ml). Die aktiven Fraktionen der CM-Sephadex-Chromatographie wurden mit Ammoniumsulfat (440 g pro Liter) versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert, in wenig Puffer A gelöst, und die Lösung ca. 10 Stunden gegen Puffer A, der mit Ammoniumsulfat zu 30% (170 g pro Liter) gesättigt worden war, dialysiert. Das Dialysat wurde dann auf die Sepharose 4B Säule aufgegeben. Anschließend wurde die Säule mit 60 % (375 g pro Liter) Ammoniumsulfat gesättigtem Puffer A gewaschen (ca. 300 ml). Danach wurde das Protein mit einem linear fallenden Ammoniumsulfatgradienten eluiert (1 000 ml zu 60% (375 g pro Liter) Ammoniumsulfat gesättigtem Puffer A und 1 000 ml zu 40% (230 g pro Liter) Ammoniumsulfat gesättigtem Puffer A). Die aktiven Fraktionen traten bei ca. 50% Ammoniumsulfat-Sättigung aus der Säule. Sie wurden vereinigt und mit dem gleichen Volumen an zu 100% (730 g pro Liter) Ammoniumsulfat gesättigtem Puffer A versetzt. Der dabei entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert und über Nacht nach Lösung in Puffer A gegen Puffer A, der 50% Glyzerin enthielt, dialysiert und bei -20°C aufbewahrt.

• Isolierung von spezifischer tRNA

• Lyophilisieren von tRNA-Lösungen

Vor dem Lyophilisieren der tRNA Lösungen wurden zunächst anorganische Salze abgetrennt:

- Bei tRNA Konzentrationen größer $5 \text{ OD}_{260}/\text{ml}$ wurde die tRNA mit drei Volumen Äthanol ausgefällt und mehrere Stunden im Kühlschrank zum Koagulieren des Niederschlages stehengelassen. Der durch Zentrifugation bei $20\,000 \text{ g}$ über 20 Minuten erhaltene Niederschlag wurde in wenig bidestilliertem H_2O gelöst und gegen bidestilliertes H_2O oder Puffer mit geringer Salzkonzentration bei 4°C dialysiert (Dialysenschlauch Visking, $0,02 \text{ mm}$ Wandstärke der Firma Roth).
- Für tRNA Konzentrationen kleiner $5 \text{ OD}_{260}/\text{ml}$ wurde die tRNA bei großen Volumina zunächst mit Konzentrierzellen (Firma Amicon, Filter UM2) eingeeengt. Kleine Volumina wurden ohne Äthanol fällung direkt gegen bidestilliertes H_2O bzw. Puffer mit geringer Salzkonzentration dialysiert.

Die dialysierten Lösungen wurden in rotierenden Kolben, die in flüssige Luft getaucht wurden, eingefroren und anschließend mit einem Gefriertrockner (New Brunswick scientific Co., New Brunswick, New Jersey /USA) lyophilisiert.

• Einbau von CMP und AMP in das 3'Ende der tRNA und Beladung der tRNA mit Aminosäure

$1\,000 \text{ OD}_{260}$ Einheiten tRNA wurden in 50 ml 120 mM Tris/HCl Puffer ($\text{pH } 9,0$, 50 mM KCl, 10 mM MgCl_2), $0,3 \text{ mM}$ CTP und $0,45 \text{ mM}$ ATP gelöst und bei 30°C mit 100 mU Nukleotidyltransferase 20 Minuten inkubiert. Nach Zugabe weiterer 50 mU Nukleotidyltransferase wurde weitere 30 Minuten inkubiert und dann mit 2 M Natriumacetatpuffer $\text{pH } 4,5$ der pH auf $5,2$ eingestellt.

2 g tRNA, deren CCA-Ende regeneriert worden war, wurden in 500 ml Puffer folgender Zusammensetzung gelöst: 75 mM Kalium-Cacodylatpuffer $\text{pH } 7,4$, 10 mM MgCl_2 , $0,1 \text{ mM}$ EDTA und 500 mg ATP.

Mit einem kleinen Aliquot dieser Lösung wurde durch Einbau von radioaktiver Aminosäure die benötigte Menge an Aminoacyl-tRNA-Synthetase festgestellt, um innerhalb von 15 Minuten eine vollständige Beladung zu erreichen. Kurz vor der Beladungsreaktion wurde die Aminoacyl-tRNA-Synthetase über eine Sephadex G-25 Säule (Bettvolumen 10faches Probevolumen), die mit 50 mM Tris/HCl Puffer (pH 7,2, 1 mM EDTA) equilibriert war, von eventuell vorhandenen Aminosäuren befreit. Zur Beladung wurden 0,02 nmol Aminosäure/l und die berechnete Menge Aminoacyl-tRNA-Synthetase zugegeben. 15 Minuten wurde bei 30°C inkubiert bevor die Reaktion durch Eiskühlung und Einstellen des pH auf 5,0 mit 2 M Natrium-Acetatpuffer pH 4,5 beendet wurde. Das Protein wurde mit Phenol von der tRNA getrennt (2.3.7.3.).

Abtrennung von Protein aus der tRNA-Lösung

a) Abtrennung des Proteins mit Phenol:

Die proteinhaltige tRNA Lösung wurde 1:1 mit einer Phenollösung, die 20% 1 M Natriumacetatpuffer (pH 4,5, 10 mM MgCl_2) enthielt, gemischt, 15 Minuten bei Zimmertemperatur gerührt und anschließend durch Zentrifugation 20 Minuten bei 20 000 g eine Phasentrennung erreicht. Die Phenolphase wurde mit 20% des Volumens 1 M Natrium-Acetatpuffer (pH 4,5, 10 mM MgCl_2) versetzt und nochmals zentrifugiert. Die wässrigen Phasen, die die tRNA enthielten, wurden zusammengegeben und weiter verwendet.

b) Abtrennung des Proteins mit DEAE-Cellulose oder DEAE-Sephadex Anionenaustauschern:

Pro 20 OD₂₆₀ tRNA wurden 1 ml DEAE-Cellulose oder DEAE-Sephadex-Gel in eine Säule gefüllt und die tRNA-Lösung, deren Chlorid-Konzentration kleiner als 0,3 M sein mußte, aufgegeben. Mit 10 mM MgCl_2 wurde alles Protein eluiert. Zur Elution der tRNA wurde 10 mM Natrium-Acetatpuffer (pH 4,5, 10 mM MgCl_2), der 1 M an NaCl war, verwendet.

Chromatographie an benzoylierter-DEAE-Cellulose (BD-Cellulose) als 1. Reinigungsschritt

Die BD-Cellulose wurde in 2 M NaCl Lösung, die 10% Äthanol enthielt, aufgeschlämmt, entgast und in eine 2 x 90 cm Säule gefüllt. 5 g tRNA wurden in 50 ml Puffer A (50 mM Na-Acetat pH 5,0, 400 mM NaCl, 10 mM MgCl_2) gelöst und nachdem die Säule mit 2 l Puffer A gespült worden war, aufgegeben. Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 32 ml/h wurde dann die Säule mit Puffer A, der aber 1,2 M an NaCl war, gespült und das Eluat in Fraktionen zu 20 ml gesammelt, bis die Extinktion im Eluat kleiner als 0,1 $\text{OD}_{260}/\text{ml}$ war. Die unter diesen Bedingungen noch auf der Säule haftende tRNA^{Phe} wurde mit Puffer B (50 mM Na-Acetat pH 5,0, 1,4 M NaCl, 10 mM MgCl_2 , 10 % Äthanol) eluiert.

Modifikation der spezifisch beladenen tRNA als Reinigungsschritt

2 g mit Aminosäure beladene tRNA (ohne tRNA^{Phe}) wurden in 100 ml 100 mM Triäthanolaminhydrochlorid/HCl-Puffer (pH 4,3, 10 mM MgCl_2) gelöst und über Nacht bei 0°C gegen 2 l des gleichen Puffers dialysiert. Unter Rühren und Eiskühlung wurde zu den 100 ml tRNA-Lösung 250 mg(2-Naphtoxy)-Essigsäure-N-Hydroxysuccinimidester in 20 ml THF zugegeben. Der pH wurde schnell mit 1 M NaOH auf pH 8,0 gebracht. Nach 5 Minuten wurde nochmals die gleiche Menge Ester in THF zugegeben und der pH nachgestellt. Danach wurde weitere 5 Minuten gerührt. Mit Essigsäure wurde der pH auf 5,0 gebracht und die tRNA mit der dreifachen Menge an Äthanol ausgefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, zunächst mit Äthanol, das 20% 1 M Natrium-Acetatpuffer (pH 4,5, 10 mM MgCl_2) enthielt, aufgeschlämmt und abermals zentrifugiert. Anschließend wurde der Niederschlag noch zweimal mit Äthanol aufgeschlämmt und jeweils wieder abzentrifugiert. Mit Wasserstrahlvakuum wurde der Niederschlag nach der letzten Zentrifugation von dem Äthanol befreit, das nicht durch Dekantieren zu ent-

fernen war. Der trockene Niederschlag wurde in 100 ml Puffer I (10 mM Natrium-Acetat pH 4,5, 10 mM MgCl_2 , 400 mM NaCl) gelöst und auf eine BD-Cellulose-Säule 5 x 30 cm gegeben, die zuvor mit 3 l Puffer I gespült worden war. Mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 160 ml/h wurde zwei Stunden lang mit Puffer I gespült. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 20 ml gesammelt. Die nicht modifizierte tRNA wurde mit Puffer II (wie Puffer I aber 1 M NaCl) eluiert, bis die Extinktion im Eluat kleiner als 0,03 $\text{OD}_{260}/\text{ml}$ war. Weitere nicht modifizierte tRNA wurde mit Puffer III (wie Puffer II aber zusätzlich 5% Äthanol) abgelöst, bevor dann mit Puffer IV (wie Puffer III aber 20% Äthanol) die modifizierte tRNA eluiert wurde.

Zur Abspaltung der modifizierten Aminosäure von der tRNA wurde die Esterbindung mit 1 M Tris/HCl-Puffer pH 9,0 drei Stunden inkubiert, anschließend mit Essigsäure neutralisiert und mit 3 Volumen Äthanol ausgefällt.

Reversed-Phase Chromatographie (RPC)

Plaskon CTFE Pulver (Poly-Chlortrifluoräthylen, Allied Chemical Corp., Morristown, New Jersey/USA) wurde mit Adogen 464 (Trialkyl ($\text{C}_8\text{-C}_{10}$) Methylammoniumchlorid, Ashland Chemical Co., Columbus, Ohio/USA) beschichtet. Dazu wurden 150 g Plaskon CTFE Pulver in einem Erlenmeyerkolben mit 300 ml Chloroform, in dem 6 ml Adogen 464 gelöst waren, gemischt und während zwei Stunden auf einem Rüttler stark bewegt. Unter Rühren in einer Glasschale wurde das Chloroform abgedampft und kurz vor Erreichen der Trockene wurde der Brei aus Plaskon-Pulver und Chloroform in einem Schüttelkolben zwei Stunden mechanisch gerüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung des quaternären Ammoniumsalzes zu erreichen. Mit Wasserstrahlvakuum wurde der Rest von Chloroform entfernt bevor das Pulver in 200 ml Startpuffer (10 mM Natrium-Acetat pH 4,5, 450 mM NaCl, 1 mM PUTA, 10 mM MgCl_2 , 3 mM 2-Mercaptoäthanol) aufgeschlämmt

in eine 1 x 150 cm Säule gefüllt wurde.

Auf die mit mehreren Säulenvolumen Startpuffer equilibrierte Säule wurden ca. 200 OD₂₆₀ tRNA in 200 - 400 µl Startpuffer gelöst aufgegeben. Die Durchflußgeschwindigkeit wurde mit einer Kolbenpumpe (HKP 25, Firma Kontron, München) auf 40 ml/h eingestellt. Wenn nicht anders angegeben, war die Fraktionsgröße 10 ml. Die tRNA wurde mit einem linearen Gradienten aus 400 ml Startpuffer und 400 ml Elutionspuffer (gleich wie der Startpuffer aber 800 mM NaCl) abgelöst. Der lineare Gradient wurde in einfacher Weise durch zwei Bechergläser, die mittels einer U-förmig gebogenen mit Startpuffer gefüllten Glasröhre verbunden waren, hergestellt. Durch Beladungstests (2.3.2.1.) oder Radioaktivitätsmessung, wenn mit radioaktiver Aminosäure beladene tRNA chromatographiert wurde, konnten die Fraktionen mit der entsprechenden tRNA gefunden und deren Reinheit bestimmt werden.

• Chromatographie an DEAE-Sephadex-Gel als letzter Reinigungsschritt zur Isolierung von tRNA^{Phe}

Eine 2 x 30 cm Säule wurde mit DEAE Sephadex-Gel A 25 (Firma Pharmacia, Uppsala/Schweden), das mit Startpuffer (20 mM Natrium-Acetat pH 5,2; 500 mM NaCl; 12,5 mM MgCl₂) aufgeschlämmt wurde, gefüllt. Vor Aufgabe der tRNA wurde die Säule mit 2 l Startpuffer gespült. Die durch BD-Cellulose Chromatographie (2.3.7.4.) angereicherte tRNA^{Phe} (1 000 OD₂₆₀) wurde nach Einbau von CMP und AMP (2.3.7.3.) auf 300 mM an NaCl gebracht und ohne das Protein zu entfernen direkt auf die Säule gegeben. Zunächst wurde die Säule zur Entfernung des Proteins mit 100 ml Startpuffer (Durchflußgeschwindigkeit 32 ml/h) gespült.

Aus 1 l Startpuffer und 1 l Elutionspuffer (20 mM Natrium-Acetat pH 5,2; 625 mM NaCl; 17,5 mM MgCl₂) wurde mit Hilfe eines Gradientmischers (Dialagrad, Firma ISCO, Lincoln, Nebraska/USA) ein linearer Gradient hergestellt. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 20 ml gesammelt. Mit Beladungstests (2.3.2.1.) wurde die Reinheit der tRNA^{Phe} bestimmt.

Die Fraktionen mit der höchsten Reinheit wurden vereinigt und lyophilisiert (2.3.7.1.).

• Chromatographie an BD-Cellulose zur Trennung von $\text{tRNA}_1^{\text{Lys}}$ und $\text{tRNA}_2^{\text{Lys}}$

Auf eine mit Startpuffer (10 mM Natrium-Acetat pH 4,5, 400 mM NaCl, 10 mM MgCl_2) equilibrierte BD-Cellulose-Säule 1 x 30 cm wurden 30 mg unspezifische tRNA, bei der die tRNA^{Lys} mit ^{14}C -Aminosäure beladen war, in 1 ml Startpuffer aufgegeben. Aus 400 ml Startpuffer und 400 ml Elutionspuffer (gleich wie Startpuffer aber 1 M NaCl) wurde mit einem Gradientenmischer (Dialagrad, Firma ISCO, Lincoln, Nebraska/USA) ein linearer Gradient erzeugt, mit dem tRNA eluiert wurde. Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug 32 ml/h. Im Eluat wurde die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen gemessen. Die $\text{tRNA}_1^{\text{Lys}}$ und $\text{tRNA}_2^{\text{Lys}}$ enthaltenden Fraktionen wurden getrennt lyophilisiert (2.3.7.1.).

• Isolierung von $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ aus Bäckerhefe

1. Schritt. BD-Cellulose-Chromatographie zur Abtrennung von $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ aus den für Valin isoakzeptierenden tRNAs

Auf eine 90 x 5 cm große mit BD-Cellulose gefüllte Säule wurden 8 g tRNA in 350 ml Puffer A (20 mmol Natrium-Formiat/1 pH 3,5, 450 mmol NaCl/1, 1 mmol EDTA/1) aufgegeben. Um nichtlösliche Verunreinigungen zu entfernen wurde die gelöste tRNA vor der Aufgabe 20 Minuten bei 12 000 g zentrifugiert. Die tRNA wurde mit einem linearen Gradienten aus 10 l Puffer A und 10 l Puffer B (gleich wie Puffer A aber 800 mmol NaCl/1) mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 150 ml/h eluiert und in Fraktionen von 20 ml gesammelt.

2. Schritt:

Eine weitere Anreicherung wurde durch Derivatisierung der mit Valin beladenen $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ erreicht. Die Derivatisierung wurde wie unter 2.3.7.5. beschrieben

durchgeführt, allerdings wurde statt pH 8,0 ein pH von 8,4 gewählt.

3. Schritt: RPC-Chromatographie

Vor Aufgabe auf die Säule (1 x 150 cm) wurde die tRNA^{Val}₁ mit ¹⁴C-L-Valin beladen. 10 - 15 mg wurden auf die RPC-Säule aufgegeben und die Chromatographie wie unter 2.3.7.6. beschrieben durchgeführt.

8. Beschreibung der physikalisch-chemischen Meßverfahren

1. Optische Messungen zur Untersuchung des Helix-Coil-Überganges von tRNA

Parallel zu den kalorimetrischen Messungen wurde mit einem Zweistrahl-UV-Spektrometer (Sp 1 800, Unicam) mit programmiert aufheizbaren Küvettenhaltern die Extinktion in Abhängigkeit von der Temperatur verfolgt. Die Aufheizgeschwindigkeit betrug konstant 1°C/min, sodaß die Änderung der Extinktion während des Aufheizens mit einem x-t-Schreiber (AR 25 linear Schreiber, Unicam) aufgezeichnet werden konnte. Zur genauen Temperaturangabe wurde die Temperatur im Küvettenblock über ein Thermoelement gemessen und jeweils mehrere Werte von Hand in die Meßkurve als Stützpunkte eingetragen.

Kalorimetrische Messungen

Beschreibung des verwendeten adiabatischen Mikrokalorimeters

Zu den Messungen wurde ein in der UdSSR gefertigtes Mikrokalorimeter vom Typ DACM-1M (Differential Adiabatic Scanning Microcalorimeter) verwendet (Privalov et al. 1975a) (siehe Abb. 5). Das Kalorimeter besteht aus je einer genau 1 ml fassenden Proben- und Referenzzelle aus Gold. Um die Zellen sind Heizwicklungen angebracht, mit denen die Zellen entsprechend der vorgegebenen Heizgeschwindigkeit erwärmt werden. Dazu fließt durch beide Zellen der gleiche Strom. Nimmt in einer Zelle die Wärmekapazität zu, so wird die Heizleistung an dieser Zelle so erhöht und an der anderen Zelle um den gleichen Betrag erniedrigt, daß keine Temperaturdifferenz zwischen den Zellen entsteht. Im Prinzip ergibt sich folgendes Schaltschema für die Regelung:

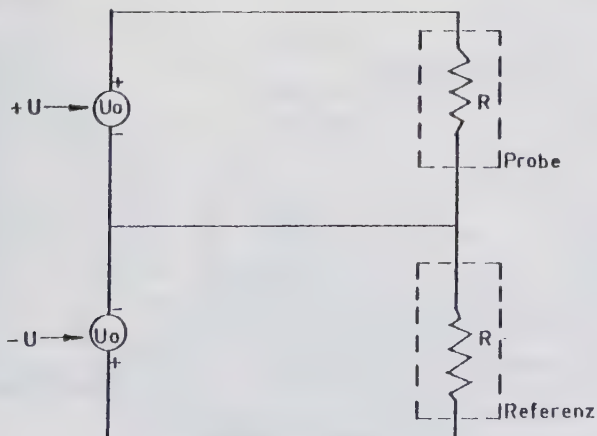
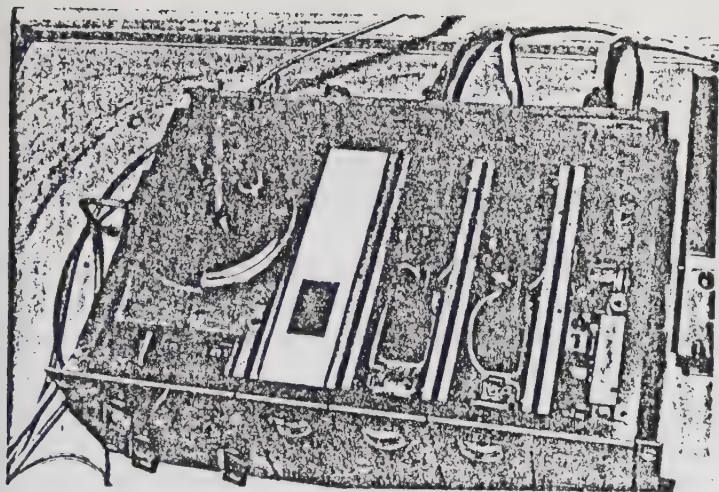
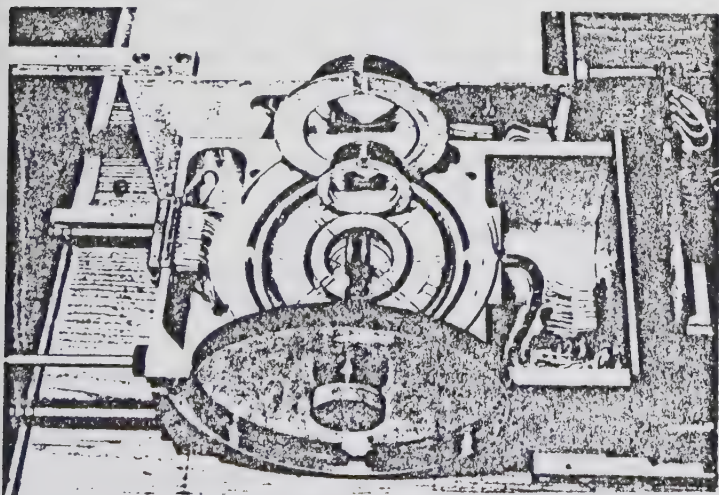


Abb. 5:



a) Sicht von oben auf das adiabatische Mikrokalorimeter DACM-1M bei abgenommener Deckplatte. Im linken Teil des Gerätes ist der runde Meßblock zu sehen.



b) Am geöffneten Meßblock sind die beiden adiabatischen Mäntel zu sehen. In der Mitte des Blocks befinden sich die Proben- und Meßzelle.

Für den Unterschied der Heizleistung ($\frac{dQ}{dt}$) an den beiden Zellen ergibt sich:

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{1}{R} \cdot (U_0 + U)^2 - (U_0 - U)^2 = \frac{4U_0}{R} \cdot U$$

R = elektrischer Widerstand des Heizdrahtes

U = elektrische Zusatzspannung

U₀ = Grundwert der Heizspannung (ohne Meßeffect)

D.h. die zusätzliche Heizleistung ist direkt proportional zu der Zusatzspannung, die erforderlich ist, damit kein Temperaturunterschied zwischen den Zellen entsteht. Ein der Zusatzspannung U entsprechendes Signal wird verstärkt über ein Keithley-Multimeter an den Y-Eingang eines X-Y-Schreibers gegeben.

Auf den X-Eingang wird ein Signal gegeben, das proportional zur Temperatur (10 mV/°C) in der Probenzelle ist. Die Adiabatischen Bedingungen werden durch einen internen und externen adiabatischen Mantel, der genau die Temperatur der Zelle hat, hergestellt.

Von dem X-Y Schreiber wird also in Abhängigkeit von der Temperatur ein Signal aufgezeichnet, das proportional der unterschiedlichen Heizleistung an den Zellen ist und damit der Leistung entspricht, die der Probenzelle im Vergleich zur Referenzzelle mehr oder weniger zugeführt werden muß. Die Fläche zwischen Grundlinie und Meßkurve ist somit proportional zur Energie, die die Probe bei einem zusätzlich zum normalen Aufheizvorgang auftretenden exothermen oder endothermen Prozeß umsetzt. Zur Kalibrierung können durch eine Zusatzheizung bei definierter Leistung Eichpeaks erzeugt werden, die eine genaue Berechnung der Energien erlauben.

Probenvorbereitung

8 bis 15 OD₂₆₀-Einheiten an tRNA wurden in 1 ml des zur Messung verwendeten Puffers gelöst und in Dialysesläuche (Visking, 0,02 mm Wandstärke, Firma Roth) gegen das 100-fache Volumen des gleichen Puffers bei 4°C dialysiert. Während der 12 bis 20 stündigen

Dialyse wurde der Puffer dreimal gewechselt. Für die Messungen im Mg^{2+} -freien Medium wurden die Proben zunächst 12 Stunden lang gegen Puffer, der 100 mmol NaCl/l und 10 mmol EDTA/l enthielt, dann 12 Stunden gegen Puffer mit 100 mmol NaCl/l und 1 mmol EDTA/l und schließlich wie oben beschrieben dreimal gegen den zur Messung verwendeten Puffer, dialysiert. Anschließend wurde die Probe mit einer 2 ml Einwegplastikspritze aufgenommen und mit Puffer auf ca. 1,5 ml aufgefüllt. Durch Anlegen eines Wasserstrahl-vakuums wurde die Lösung vor der kalorimetrischen Messung entgast.

Durchführung der kalorimetrischen Messungen

Die entgaste Probe wurde aus der Plastikspritze mit einer Injektionsnadel direkt in die 1 ml fassende Probenzelle des Kalorimeters gefüllt. Dabei mußte sorgfältig darauf geachtet werden, daß luftblasenfrei gefüllt wurde. In die Referenzzelle wurde auf die gleiche Weise 1 ml Puffer eingefüllt. Um Blasenbildung während der Messung zu verhindern, wurde auf die Füllungen von Proben- und Referenzgefäß ein Außendruck von 200 kPa angelegt. Mit dem eingebauten Peltierelement wurde das Kalorimeter anschließend auf 4°C abgekühlt. Darauf wurde das Proben- und Referenzgefäß mit einer Geschwindigkeit von 0,1°C/min aufgeheizt, bis die Temperaturen der beiden adiabatischen Mäntel angeglichen waren, und sich die Regelinstrumente eingestellt hatten. Ab 15°C wurde dann mit einer Geschwindigkeit von 1°C/min weiter aufgeheizt. Nach Beendigung der Messung wurde die Probe entnommen und über eine Phosphatbestimmung (2.3.1.1.) die Konzentration an tRNA bestimmt.

Zur Messung der Grundlinie wurde sowohl das Proben- wie auch das Referenzgefäß mit Puffer gefüllt und wie oben beschrieben eine Meßkurve aufgenommen.

1. Auswertung der kalorimetrischen Messungen

Zur Kalibrierung des Kalorimeters wurde durch Einschalten einer Zusatzheizung mit definierter Heizleistung ($10 \mu W$) während vier Minuten ein Eichpeak erzeugt. Die Fläche zwischen Grundlinie und Meßkurve wurde durch Ausschneiden und Abwägen bestimmt. Durch Vergleich mit der Fläche eines Eichpeaks konnte die entsprechende Energie ausgerechnet werden.

$$E_M \text{ [mJ]} = \frac{F_M \text{ [mg]} \cdot E_E \text{ [mJ]}}{F_E \text{ [mg]}}$$

E_M = Die der Fläche unter der Meßkurve entsprechende Energie [mJ]

F_M = Das der Fläche unter der Meßkurve entsprechende Gewicht [mg]

E_E = Die der Fläche des Eichpeaks entsprechende Energie [mJ]

F_E = Das der Fläche des Eichpeaks entsprechende Gewicht [mg]

Dann ließen sich die molaren Umwandlungsenthalpien aus der über die Phosphatanalyse bestimmten Menge an tRNA nach folgender Formel ausrechnen:

$$\Delta H_u \text{ [kJ/mol]} = \frac{E_M \text{ [kJ]}}{M \text{ [mol]}}$$

mit

$$M \text{ [mol]} = \frac{P \text{ [g]} \cdot I}{MG_P \text{ [g/mol]} \cdot N}$$

ΔH_u = Enthalpiezuwachs für die Helix-Coil-Umwandlung [kJ/mol]

M = Die in der Probe enthaltene Molzahl an tRNA [mol]

P = Der im Probenvolumen (1 ml) enthaltene Phosphor [g]

MG_P = Atomgewicht des Phosphors (30,9738 g/mol)

N = Anzahl der Nukleotide der tRNA

3. Ergebnisse und Diskussion

1. Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und Nukleotidyltransferase

1. Zur Funktion der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen

Die Aminoacyl Synthetasen katalysieren die Veresterungsreaktion der tRNA mit der entsprechenden Aminosäure.

Seit Entdeckung der Aminoacyl-tRNA Synthetase (Hoagland et al. 1955) und dem Nachweis der Bildung von Aminosäureadenylat (De Moss et al. 1956), das als Substrat dient (Berg et al. 1958), ist allgemein folgender Mechanismus angenommen worden:

Zunächst bildet das Enzym (E) aus Aminosäure (AS) und ATP eine am Enzym gebundene Aminosäure-AMP-Verbindung unter Freisetzung von Pyrophosphat (PP_i), gefolgt von einem Transfer der Aminosäure auf die tRNA.



Später (Loftfield 1972) ist ein konzentrierter Reaktionsmechanismus postuliert worden, bei dem zunächst Aminosäure, ATP und tRNA vom Enzym gebunden werden und dann gleichzeitig drei Produkte gebildet werden, da Untersuchungen ergeben hatten, daß der Umsatz des $E \cdot AS - AMP$ Komplexes langsamer ist als die Gesamtreaktionsgeschwindigkeit und Aminoacyl-tRNA Synthetasen gefunden worden sind, die den $ATP - PP_i$ Austausch (siehe Reaktionsschema (1)) nur bei Anwesenheit von tRNA möglich machen. Der konzentrierte Mechanismus ist auch durch ein Experiment (Lövgren et al. 1975) gestützt worden, bei dem gleiche Mengen von freiem Enzym und $E \cdot {}^{14}C$ -Aminosäure-AMP Komplex mit einer begrenzten Menge tRNA, ATP und 3H -Aminosäure umgesetzt worden sind. Es wurde mehr mit 3H -Aminosäure als mit ${}^{14}C$ -Aminosäure beladene tRNA gefunden und damit scheinbar gezeigt, daß freie Aminosäure schneller reagiert, als der Komplex $E \cdot {}^{14}C$ -Aminosäure-AMP.

Darauf ist gezeigt worden (Kim et al. 1977), daß sich unter den Bedingungen der Untersuchung von Lövgren durch schnelle Rückreaktion (siehe Reaktionsschema (1)) frei werdende ^{14}C -Aminosäure bildet und sich mit der im Überschuß vorhandenen ^3H -Aminosäure mischt und damit kein Widerspruch zu dem schon früher postulierten zweistufigen Reaktionsmechanismus besteht.

2. Zur Anreicherung der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen spezifisch für Lysin, Valin und Phenylalanin

Die Anreicherung wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Lagerkvist und Waldenström (1967), Bhanot et al. (1974) und Chlumeck et al. (1969) durchgeführt. Nach dem Zellaufschluß mit Toluol und der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung (siehe 2.3.5.) wurde eine DEAE-Cellulose-Chromatographie verwendet, um den größten Teil des Fremdproteins abzutrennen (siehe Abb. 6 und den dazu gehörenden Text).

Die DEAE-Cellulose-Chromatographie brachte eine über 20-fache Anreicherung für die tRNA^{Lys} spezifische Aminoacyl-Synthetase, die dann eine spezifische Aktivität von ca. 20 mU/mg hatte bei einer Ausbeute von ca. 150 mg Protein aus 500 g Hefe. Die Enzympräparate waren nach der DEAE-Cellulose Chromatographie soweit nukleasenfrei, daß bei der Beladungsreaktion keine Abnahme der Beladbarkeit durch Nukleasenaktivität bei längerer Inkubation gemessen werden konnte. Dies war vor allem wichtig für die Beladung größerer Mengen tRNA (siehe 2.3.7.5.).

3. Zur Funktion der Nukleotidyltransferase

tRNA-Nukleotidyltransferase katalysiert den Einbau von CMP und AMP an das 3'Ende von tRNA, der das CCA-Ende teilweise oder ganz fehlt (Sternbach et al. 1971, Deutscher et al. 1974, Seidmann und Mc Clain 1975).



An das 3'OH-Ende der Polynukleotidkette wird die Δ Phosphatgruppe eines Nukleosid-5'Triphosphates geknüpft analog der Katalysfunktion der RNA- und DNA-Polymerasen.

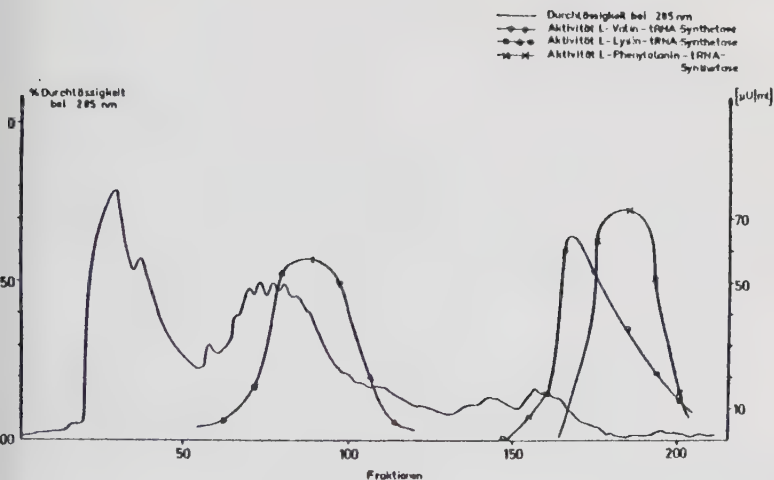


Abb. 6:

250 ml der über Sephadex-Gel G-25 entsalzten Proteinlösung wurden auf eine 30 x 5 cm große, mit DEAE-Cellulose gefüllte Säule aufgegeben. Bei einer Durchflußrate von 160 ml/h wurde das Protein mit einem Gradienten aus Puffer A (20 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 7,5; 20 mM 2-Mercaptoäthanol; 1 mM EDTA) und steigendem Anteil Puffer B (250 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 6,5; 20 mM 2-Mercaptoäthanol; 1 mM EDTA) eluiert und in Fraktionen zu 20 ml gesammelt. Durch Beladungstests wurden die Aminoacyl-tRNA Synthetasen enthaltenden Fraktionen ermittelt und mit 550 g Amoniumsulfat pro Liter ausgefällt.

4. Zur Anreicherung der Nukleotidyltransferase

Die Anreicherung der Nukleotidyltransferase wurde durchgeführt nach einer noch nicht veröffentlichten Vorschrift, die mir von Herrn Dr. H. Sternbach, Max Planck Institut für experimentelle Medizin, Göttingen, überlassen wurde. Aus 3 kg Bäckerhefe wurden durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung, Chromatographie an CM-Sephadex-Kationenaustauscher und Sepharose 4B (siehe 2.3.6.) 1 500 mM Nukleotidyltransferase isoliert, die keine störende Aktivität an Nukleasen enthielt, so daß auf den in der Vorschrift vorgesehenen weiteren Reinigungsschritt, der zu einem vollkommen reinen Enzym führt, verzichtet wurde. (Abb. 7 CM-Sephadex-Chromatographie). Als Proteasenhemmer wurde Phenylmethylsulfonsäurefluorid zugesetzt.

2. Zur Isolierung spezifischer tRNA

1. Diskussion von in der Literatur beschriebenen Reinigungsverfahren

Die Trennverfahren für tRNA beruhen auf den unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften wie Ladung, Löslichkeit, Größe, Gestalt, Denaturierbarkeit und Spezifität ihrer Funktion. Außer der Spezifität der Funktion sind die Unterschiede in den anderen Eigenschaften der tRNA sehr gering und einzelne Reinigungsschritte führen meistens nicht zur vollständigen Trennung. Daher müssen die geringen unspezifischen Unterschiede in mehreren Reinigungsschritten ausgenützt werden. Die in der Literatur hauptsächlich verwendeten Verfahren beruhen auf flüssig-flüssig Verteilung, Absorptionschromatographie, Ionenaustauschchromatographie oder auch Kombinationen dieser Prozesse. Oft angewandte Verfahren sind Gegenstromverteilungschromatographien an DEAE-Cellulose (Baguley et al. 1965), DEAE-Sephadex (Nishimura et al. 1967), ECTEOLA-Cellulose (Bradley und Rich 1956), Hydroxylapatit

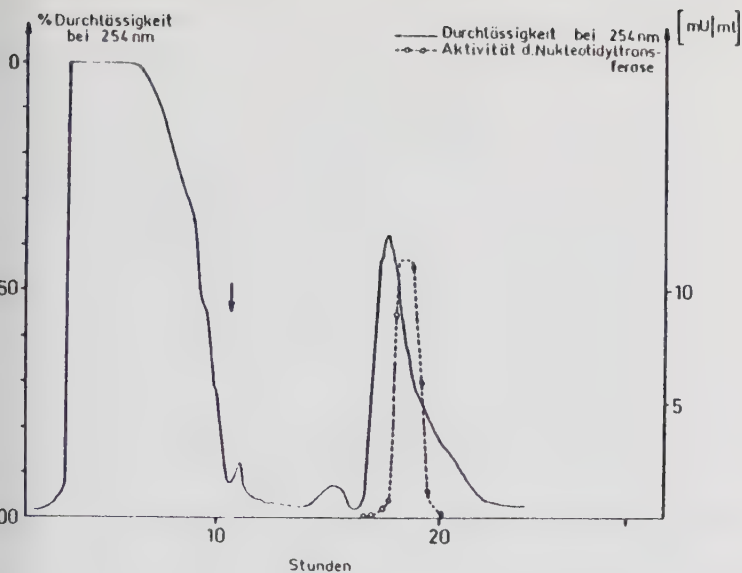


Abb. 7:

400 ml der gegen den Startpuffer (30 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 7,1; 0,5 mM EDTA; 5% Glyzerin) dialysierten Proteinlösung wurden auf eine 40 x 5 cm große, mit CM-Sephadex C-50 gefüllte Säule aufgegeben. Bei einer Durchflußrate von 160 ml/h wurde ein großer Teil des Proteins mit Startpuffer, der aber zusätzlich noch 50 mmol KCl/l enthielt, abgelöst. Mit Startpuffer, der 200 mmol KCl/l enthielt (der Pfeil im Diagramm zeigt den Pufferwechsel), konnte die Nukleotidyltransferase eluiert werden.

(Hartmann und Coy 1961, Pearson und Kelmers 1966),
und BD-Cellulose (Gillam et al. 1967).

Verfahren, die die Spezifität der Funktion zur
Isolierung benutzen, verwenden die hohe Selektivität
der Aminoacyl-Synthetasen, die die gewünschte tRNA mit
der dazugehörigen Aminosäure verestern. Anschließend
kann der Unterschied zwischen beladener und unbeladener
tRNA zur Trennung ausgenutzt werden. Mit Perjodat
(Zamecnik et al. 1960) kann bei hoher Selektivität die
nicht veresterte tRNA oxidiert werden und als Derivat
von Hydrazin abgetrennt werden. Bei ähnlichen Verfahren
wird die beladene tRNA durch unlösliche Derivate der
gebundenen Aminosäuren von der unbeladenen tRNA ab-
getrennt (Brown et al. 1959, Mehler et al. 1963,
Simon et al. 1964). Mit BD-Cellulose Chromatographie
läßt sich tRNA, deren Aminosäure über die NH₂-Gruppe mit
einer aromatischen Carbonsäure verestert ist, von der
übrigen tRNA abtrennen (Gillam et al. 1968).

Die Verfahren, die die spezifische Funktion der tRNA
zur Isolierung ausnützen, liefern schon mit einem
Reinigungsschritt sehr reine tRNA. Allerdings sind diese
Verfahren, abgesehen von der Methode von Gillam et al.
(1968), nicht sehr gebräuchlich.

Zur Verwendung von BD-Cellulose-, Reversed-Phase- Chromatographie und einer Modifikation von beladener tRNA für die Isolierung spezifischer tRNA

BD-Cellulose wird aus Diäthyl-Aminoäthyl-Cellulose
durch Veresterung freier OH-Gruppen der Cellulose mit
Benzoylchlorid hergestellt. (siehe Abb. 8.)

Durch Einführen der Benzoylgruppen ergeben sich zu-
sätzlich zu den ionischen Wechselwirkungen zwischen
den je nach pH-Wert verschieden stark protonierten
Triäthylammonium-Gruppen und den Phosphatresten der
tRNA auch hydrophobe Wechselwirkungen der Benzoyl-
Gruppen mit hydrophoben Gruppen an exponierten Stellen
der tRNA.

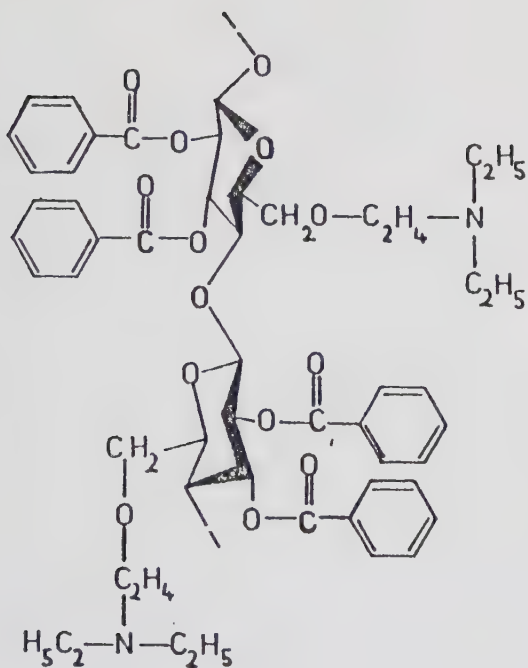


Abb. 8:

Ausschnitt aus der langen Kohlehydratkette von benzoylierter
DEAE-Cellulose (BD-Cellulose)

Bei der Chromatographie von tRNA an BD-Cellulose lassen sich mit Puffern, die 1 mol NaCl/l haben, alle tRNAs außer der für Phenylalanin spezifischen, die in der Nähe des Anticodons einen großen hydrophoben Rest, die Y-Base, besitzt, ablösen. Erst wenn Alkohol oder Harnstoff, die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen tRNA und BD-Cellulose aufheben, im Puffer zugesetzt werden, kann die tRNA^{Phe} eluiert werden. Auf diese Weise läßt sich sehr schnell in großen Mengen hochreine tRNA^{Phe} isolieren (Gillam et al. 1967, Wimmer et al. 1968, Bode et al. 1974). tRNA^{Tyr} und tRNA^{Trp} werden ebenso stark wie tRNA^{Phe} an BD-Cellulose festgehalten, wenn sie mit ihrem aromatischen Aminosäuren beladen sind (Maxwell et al. 1968).

Die besondere Affinität der BD-Cellulose zu aromatischen Gruppen läßt sich auch zur Isolierung jeder beliebigen tRNA ausnutzen, da sich solche aromatischen Gruppen gezielt mit der tRNA verknüpfen lassen (Gillam et al. 1968). Die zu isolierende tRNA wird unter Verwendung der Aminoacyl-Synthetase mit der entsprechenden Aminosäure beladen, deren freie Aminogruppe mit einer aromatischen Carbonsäure verestert wird. Z.B. Phenoxyessigsäure und 2-Naphtoxyessigsäure bilden selektiv mit den NH₂-Gruppen, der an die tRNA gebundenen Aminosäuren eine Amidbindung. Für die Reaktion werden die N-Hydroxysuccinimidester der Carbonsäuren eingesetzt und die Reaktion bei pH 7,9 - pH 8,6 (Clark und Carbon 1974, Gillam et al. 1968, Wittig et al. 1973) durchgeführt. Unter diesen Bedingungen gibt es, wenn überhaupt, nur wenig Nebenreaktionen mit unbeladener tRNA (Gillam et al. 1968, Grott et al. 1966). Da die Esterbindung zwischen Aminosäure und tRNA bei pH-Werten um 8 schon merklich hydrolysiert wird, muß die Substitutionsreaktion durch die aromatischen Carbonsäuren sehr schnell verlaufen und es muß ein Optimum zwischen vollständiger Beladung und teilweiser Hydrolyse der tRNA-Aminosäurebindung gefunden werden.

Die über die Modifikation isolierte tRNA besteht aus einem Gemisch der für die verwendete Aminosäure isoakzeptierenden tRNAs. Zur weiteren Auftrennung eignet sich für kleinere Mengen tRNA (kleiner als 100 mg) Reversed-Phase Chromatographie (Kelmers et al. 1965, Pearson et al. 1971), die sehr gute Trennungseigenschaften hat. Als Trägermaterial bei dieser hochauflösenden Säulenchromatographie (High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)) werden 10 μ m große Teilchen aus Poly-Trifluorchloräthylen verwendet, die mit einem quarternären Alkyl-Ammoniumsalz beschichtet sind (RPC-5, Pearson et al. 1971). Das Säulenmaterial ist ein Anionenaustauscher, der durch die Alkylgruppen auch hydrophobe Wechselwirkungen mit der tRNA ausüben kann.

• Zur Isolierung von tRNA^{Phe} und tRNA^{Lys}

• BD-Cellulose Chromatographie als erster Reinigungsschritt

Als Ausgangsmaterial wurde ein Gemisch der tRNAs aus Bäckerhefe (Böhringer, Mannheim) verwendet. Zur Abtrennung von tRNA^{Phe} wurde zunächst BD-Cellulose der Firma Serva verwendet. Die Trennung wurde nicht erreicht, da die tRNA^{Phe} ohne Zusatz von Äthanol mit einer NaCl-Konzentration kleiner als 1 mol/l abgelöst wurde. Von BD-Cellulose der Firma Boehringer konnte die tRNA^{Phe} wie erwartet (Wimmer et al. 1968) erst unter Zusatz von 10% Äthanol zum Puffer abgelöst werden, während die übrigen tRNAs mit NaCl allein eluiert wurden. Da bei tRNA aus Bäckerhefe nur 15 - 20% ein vollständiges CCA-Ende haben, (Schneider et al. 1972) wurden sowohl die tRNA^{Phe}-haltigen Fraktionen wie auch die übrige tRNA mit CTP und ATP bei Verwendung von Nukleotidyltransferase regeneriert. Die von tRNA^{Phe} abgetrennte tRNA konnte zur Isolierung von tRNA^{Lys} mit der Modifikationsmethode weiter benutzt werden, während die tRNA^{Phe}-haltigen Fraktionen zur weiteren Reinigung auf eine DEAE-Sephadex-Säule gegeben wurden.

Isolierung von tRNA^{Phe} mit DEAE-Sephadex-Chromatographie

Bei der über BD-Cellulose-Chromatographie abgetrennten tRNA^{Phe} mußte nach dem Regenerieren der CCA-Sequenz die Nukleotidyltransferase und das überschüssige ATP und CTP wieder aus der tRNA Lösung entfernt werden. Da die tRNA^{Phe} noch nicht vollständig rein war, sollte sie weiter angereichert werden. Dies läßt sich beides mit DEAE-Sephadex-Chromatographie erreichen (Schneider et al. 1972).

Mit Puffer, der 300 mmol NaCl/l enthielt, konnten die Nukleotidyltransferase, das ATP und CTP vom DEAE-Sephadex-Gel eluiert werden, während unter diesen Bedingungen die tRNA noch nicht abgelöst wurde und so vom Enzym vollständig getrennt werden konnte. Durch einen Gradienten mit steigender Konzentration an NaCl konnte eine weitere Trennung des tRNA-Gemisches erreicht werden und reine tRNA^{Phe} erhalten werden.

Weitere Anreicherung der tRNA^{Lys} durch Modifikation der beladenen tRNA

Das bei der BD-Cellulose-Chromatographie (3.2.3.1.) von tRNA^{Lys} befreite und mit Nukleotidyltransferase regenerierte tRNA-Gemisch wurde mit Lysin beladen (2.3.7.2.). Ein Aliquot der eingesetzten tRNA wurde mit radioaktiver Aminosäure beladen, um den Fortgang der Modifikation und der anschließenden Chromatographie besser zu verfolgen. In Vorversuchen wurde ermittelt, daß für die Substitution mit 2-Naphthoxyessigsäuresuccinimidester pH 8,0 am geeignetsten ist. Wenn die Substitution bei pH 8,6 durchgeführt wurde, spaltete sich ein größerer Teil der tRNA-Aminosäurebindung (siehe Abb. 9a und den dazugehörenden Text). Mit pH 8,0 und pH 8,2 (siehe Abb. 9b) lief die Substitutionsreaktion nicht vollständig ab, es wurde aber weniger tRNA hydrolysiert und so ergab sich ungefähr die gleiche Ausbeute an tRNA^{Lys} wie bei pH 8,6, wobei die bei pH 8,0 modifizierte tRNA das reinere Produkt lieferte. Aus diesen Gründen wurde die Modifikation bei pH 8,0, wie unter 2.3.7.5. beschrieben, durchgeführt.

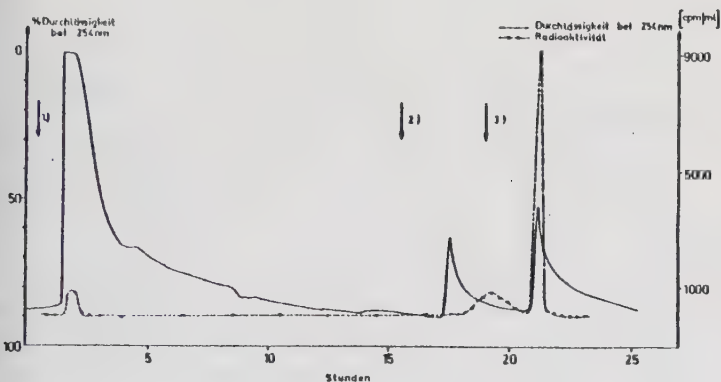


Abb. 9:

BD-Cellulose-Chromatographie von derivatisierter
 ^{14}C -Lysin-tRNA^{Lys}:

50 mg tRNA wurden in 10 mM Natrium-Acetatpuffer (pH 4,5; 10 mM MgCl_2), der 350 mmol NaCl/l enthielt, gelöst und auf eine 30 x 1,5 cm große mit BD-Cellulose gefüllte Säule bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 16 ml/h gegeben. Mit demselben Puffer, der aber nacheinander:

- 1.) 1 mmol NaCl/l;
- 2.) 1 mol NaCl/l und 5% Äthanol
- 3.) 1 mol NaCl/l und 20% Äthanol

enthielt, wurde die tRNA eluiert und in Fraktionen zu 10 ml gesammelt. Die Pufferwechsel sind im Diagramm jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet.

a) tRNA modifiziert bei pH 8,6:

Mit Puffer, der 1 mol NaCl/l enthielt, wurden nur ca. 5% der mit ^{14}C -Lysin beladenen tRNA (----) eluiert.

D.h. die Modifikationsreaktion verlief nahezu vollständig, allerdings wurden dabei ca. 20% der Aminosäure - tRNA-Bindung hydrolysiert.

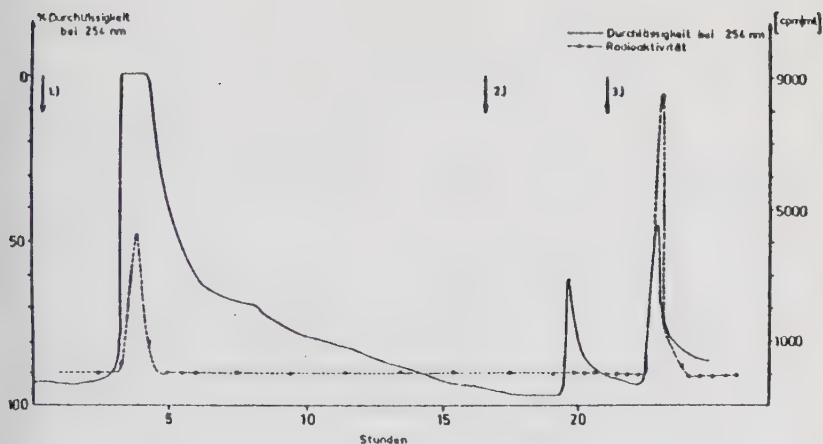


Abb. 9:

b) tRNA modifiziert bei pH 8,0:

Schon mit Puffer, der 1 mol NaCl/l enthielt, wurden ca. 30% der mit ^{14}C -Lysin beladenen tRNA (----) eluiert.

D.h. die Modifikation ist vollständig verlaufen.

Das tRNA-Gemisch mit der modifizierten beladenen tRNA wurde an BD-Cellulose chromatographiert. Mit Puffer, der 1 mol NaCl/l enthielt, wurde alle bis auf die modifizierte tRNA eluiert, die unter Zusatz von Äthanol analog der tRNA^{Phe} abgelöst wurde. Bei ca. 10% Ausbeute konnte so innerhalb von drei Tagen ca. 15 mg tRNA^{Lys} gewonnen werden (siehe Abb. 10). Nach Spaltung der Esterbindung zwischen tRNA und Aminosäure wurde durch Hydrolyse bei pH 9,0 ein Gemisch der für Lysin isoakzeptierenden tRNAs erhalten, die durch einen weiteren Reinigungsschritt getrennt wurden.

4. Zuordnung der beiden Lysin-spezifischen isoakzeptierenden tRNAs

Isoakzeptierende tRNAs werden durch einen Index unterschieden, der oft nach der Reihenfolge der Elution bei einer Chromatographie zugeordnet wird. Der Index bei tRNA₁^{Lys} und tRNA₂^{Lys} entspricht der Reihenfolge der Elution bei BD-Cellulose-Chromatographie (Sen und Ghosh 1973). Zur Zuordnung der durch RPC getrennten Lysin-spezifischen isoakzeptierenden tRNAs wurde mit ¹⁴C-Lysin beladene tRNA an BD-Cellulose chromatographiert (2.3.7.9. und Abb. 11). tRNA₁^{Lys} und tRNA₂^{Lys} wurden dann getrennt mit RPC chromatographiert, wobei gezeigt wurde, daß wie bei der BD-Cellulose-Chromatographie tRNA₁^{Lys} zuerst und tRNA₂^{Lys} als zweite tRNA eluiert wurde (siehe Abb. 12). tRNA₂^{Lys} ist identisch (Sen und Ghosh 1973) mit der von Madison et al. (1972) sequenzierten tRNA^{Lys}.

5. Trennung der isoakzeptierenden tRNAs mit Reversed-Phase-Chromatographie

Die durch Modifikation (3.2.3.3.) isolierte tRNA wurde mit ¹⁴C-Lysin beladen, um im Eluat die tRNA^{Lys} enthaltenden Fraktionen leicht zu finden. Die Chromatographie (2.3.7.6.) ergab für die Radioaktivität zwei getrennte Peaks (siehe Abb. 13), die mit zwei Peaks für die Extinktion bei 260 nm parallel laufen, wie das für reine tRNA zu

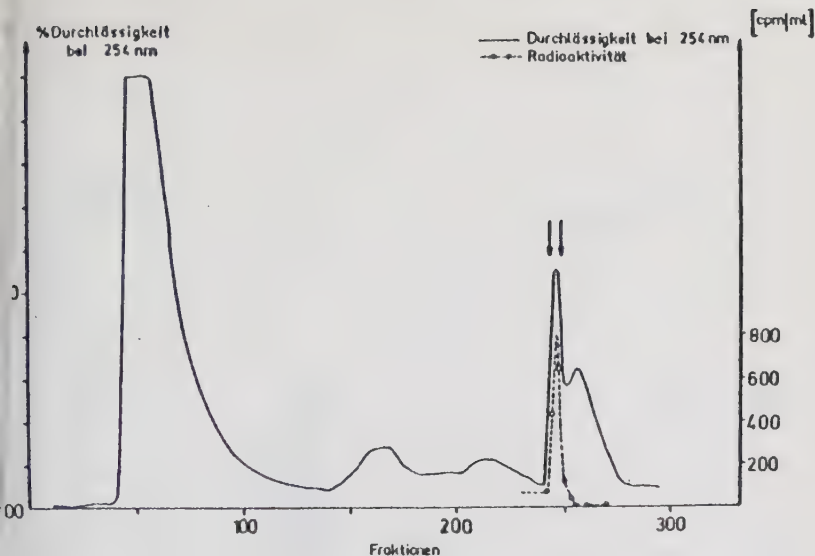


Abb. 10:

2 g tRNA (ohne tRNA^{Phe}) mit modifizierter Lysin-tRNA^{Lys} (ein Teil des Lysins war ¹⁴C-markiert) wurde in 100 ml Startpuffer (10 mM Natrium-Acetat pH 4,5; 10 mM MgCl₂), der 350 mM NaCl/l enthielt, auf eine 30 x 5 cm große, mit BD-Cellulose gefüllte Säule aufgegeben. Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 160 ml/h wurde die tRNA in Stufen mit 10 mM Natrium-Acetatpuffer (pH 4,5; 10 mM MgCl₂) eluiert, der nacheinander folgende Zusätze enthielt:

- 1.) 1 mol NaCl/l
- 2.) 1 mol NaCl/l und 5% Äthanol
- 3.) 1 mol NaCl/l und 20% Äthanol

Der durch zwei Pfeile begrenzte Bereich gibt die Fraktionen an, die tRNA^{Lys} enthielten und weiter aufgereinigt wurden.

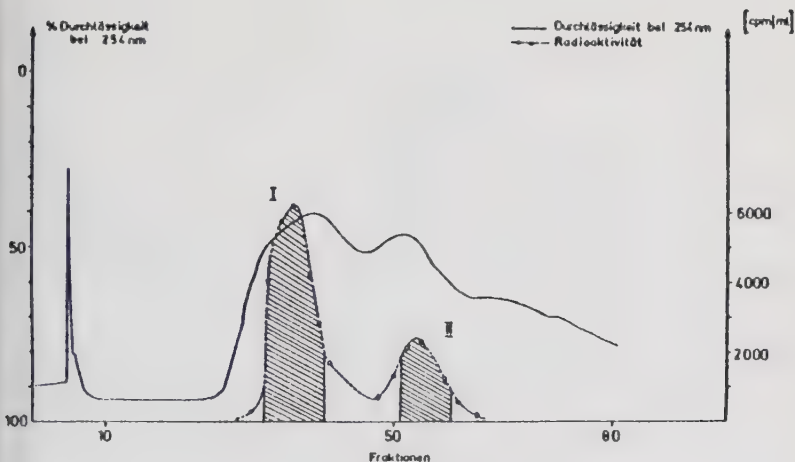


Abb. 11:

30 mg unspezifische $tRNA$, deren Anteil an $tRNA^{Lys}$ mit ^{14}C -Lysin beladen war, wurde über eine 30 x 1 cm große, mit BD-Cellulose gefüllte Säule aufgetrennt. Mit einem linearen Gradienten aus 400 ml Startpuffer (10 mM Natrium-Acetat pH 4,5; 400 mM NaCl; 10 mM $MgCl_2$) und 400 ml Elutionspuffer (gleich wie Startpuffer aber 1 mol/NaCl/l) wurde die $tRNA$ bei einer Durchflußrate von 32 ml/h eluiert und in Fraktionen zu 10 ml gesammelt. Die schraffierten Flächen zeigen die Fraktionen, die zur weiteren Untersuchung verwendet wurden. Peak I enthält $tRNA_1^{Lys}$ und Peak II $tRNA_2^{Lys}$ (Sen und Gosh 1973).



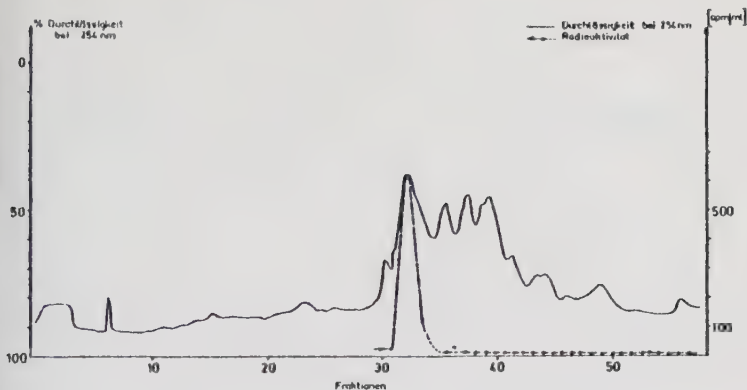


Abb. 12:

a) Um zu untersuchen, welche Reihenfolge der Elution von $\text{tRNA}_1^{\text{Lys}}$ und $\text{tRNA}_2^{\text{Lys}}$ bei der RPC-Chromatographie besteht, wurde die $\text{tRNA}_1^{\text{Lys}}$ von Peak I der BD-Cellulose-Chromatographie (siehe Abb. 11) mit ^{14}C -Lysin beladen und auf eine 1 x 50 cm große RPC-Säule gegeben. Mit einem Gradienten aus 400 ml Startpuffer (10 mM Natrium-Acetat pH 4,5; 450 mM NaCl; 10 mM MgCl_2 ; 1 mM EDTA; 3 mM 2-Mercaptoäthanol) und steigendem Anteil Elutionspuffer (wie Startpuffer aber 800 mmol NaCl/l) abgelöst und in Fraktionen zu 15 ml gesammelt. Aus Radioaktivitätsmessungen im Eluat war ersichtlich, daß die $\text{tRNA}_1^{\text{Lys}}$ als eine der ersten tRNAs zwischen Fraktion 31 und 33 eluiert wurde.

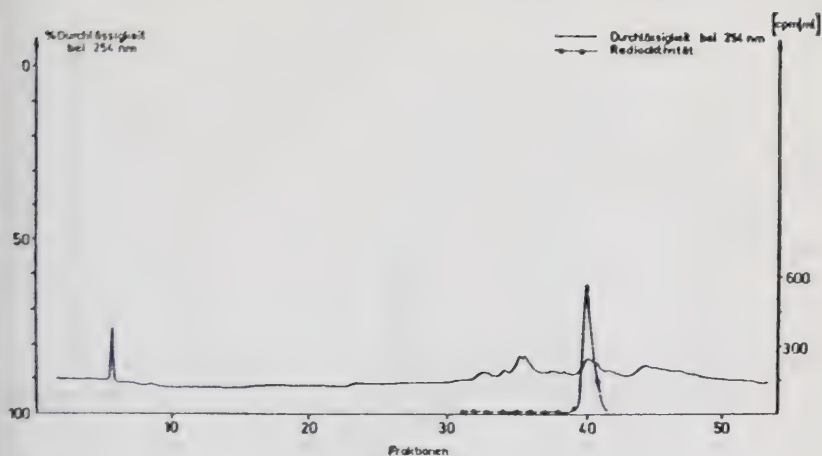


Abb. 12:

b) $\text{tRNA}_2^{\text{Lys}}$ von Peak II der BD-Cellulose-Chromatographie (siehe Abb. 11) wurde wie unter a) beschrieben chromatographiert. Aus den Radioaktivitätsmessungen im Eluat war ersichtlich, daß die $\text{tRNA}_2^{\text{Lys}}$ als eine der letzten tRNAs zwischen Fraktion 39 und 41 eluiert wurde. Damit ist gezeigt, daß bei der RPC-Chromatographie $\text{tRNA}_1^{\text{Lys}}$ vor $\text{tRNA}_2^{\text{Lys}}$ eluiert wird.

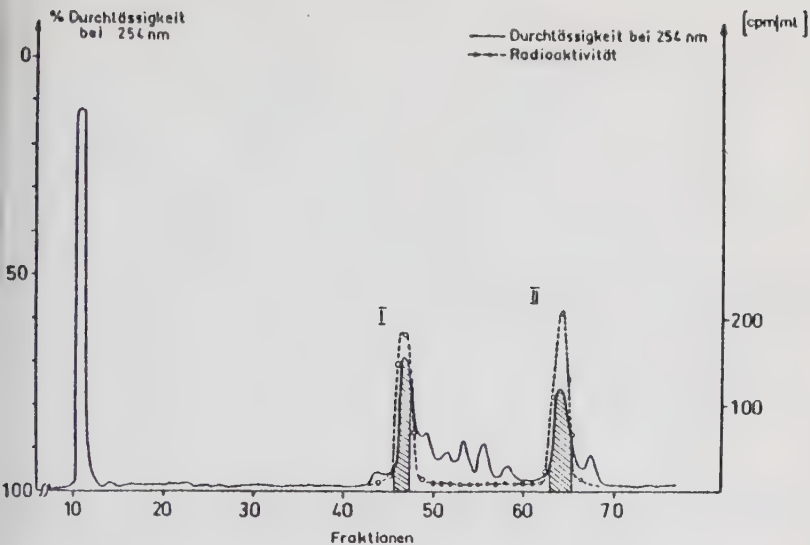


Abb. 13:

Ca. 200 OD₂₆₀, der durch Derivatisierung (3.2.3.3.) angereicherten und mit ¹⁴C-Lysin beladenen tRNA^{Lys}, wurden auf eine RPC-Säule (150 x 1 cm) aufgegeben. Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 40 ml/h wurde die tRNA mit Hilfe eines Gradienten aus Startpuffer (400 ml; 10 mM Natrium-Acetat pH 4,5; 450 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10 mM MgCl₂; 3 mM 2-Mercaptoäthanol) und linear steigendem Anteil Elutionspuffer (400 ml, wie Startpuffer, aber 800 mmol NaCl/l) von der Säule abgelöst und in Fraktionen zu 10 ml gesammelt. Peak I enthielt tRNA₁^{Lys} und Peak II tRNA₂^{Lys}.



tRNAs war größer als 1400 pmol/OD₂₆₀, das entspricht einer Reinheit größer als 90%.

Isolierung von tRNA^{Val}₁ aus Bäckerhefe

1. Schritt: BD-Cellulose-Chromatographie zur Abtrennung von tRNA^{Val}₁ von den für Valin isoakzeptierenden tRNAs

BD-Cellulose eignet sich, um die tRNA^{Val}₁ von tRNA^{Val}_{2a} und tRNA^{Val}_{2b} (Kryukov et al. 1972) abzutrennen. Der Anteil der tRNA^{Val}₁ am Gemisch der für Valin isoakzeptierenden tRNAs beträgt 70%. tRNA^{Val}_{2a} und tRNA^{Val}_{2b} wurden unten in Kapitel 2.3.7.10. angegebenen Bedingungen in einem breiten flachen Peak vor tRNA^{Val}₁ eluiert. Die Anreicherung der tRNA^{Val}₁ durch die BD-Cellulose-Chromatographie war ca. dreifach. Vor der weiteren Aufarbeitung wurden mit Nukleotidyltransferase eventuell fehlende CCA-Sequenzen regeneriert (2.3.7.2.).

2. Schritt: Weitere Anreicherung durch Derivatisierung der beladenen tRNA^{Val}₁

tRNA^{Val}₁ wurde nach der BD-Cellulose-Chromatographie mit L-Valin beladen (2.3.7.2.). Die Modifikation wurde wie unter 2.3.7.5. beschrieben durchgeführt. Allerdings wurde die Reaktion bei pH 8,4 durchgeführt, da die bei Lys-tRNA^{Lys} angewandten Bedingungen nur zu geringen Ausbeuten an modifizierter Val-tRNA^{Val}₁ führten. Die bei diesem Schritt erhaltene tRNA war zu 50 - 70% rein.

3. Schritt: RPC-Chromatographie

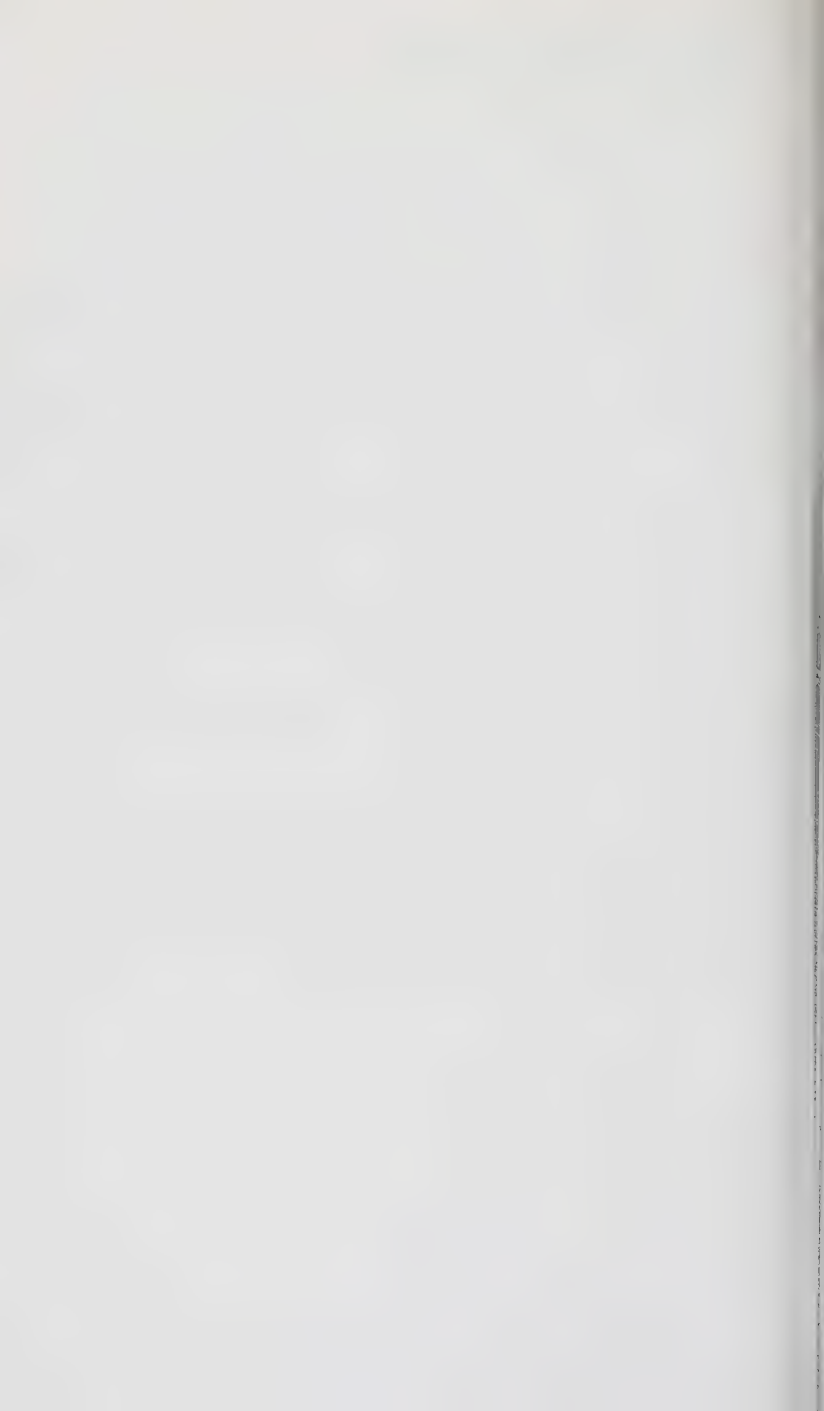
RPC-Chromatographie wurde als letzter Reinigungsschritt gewählt und wie unter 2.3.7.6. beschrieben ausgeführt. Nach der RPC-Chromatographie ergab sich für die tRNA^{Val}₁ eine Beladbarkeit von ca. 1 600 pmol pro OD₂₆₀ und die tRNA war damit als rein zu betrachten.



Reinheit der isolierten tRNA

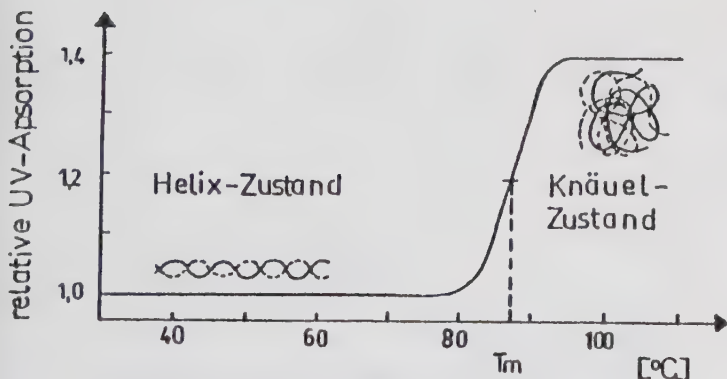
Die Reinheit der tRNA wurde über die Beladbarkeit mit ^{14}C -Aminosäure (2.3.2.1.) bestimmt und in pmol eingebaute Aminosäure pro OD_{260} angegeben. Zur Bestimmung der Reinheit wurden die Werte mit den in der Literatur angegebenen Werten für die Beladbarkeit reiner tRNA verglichen. Allerdings sind die Angaben nicht einheitlich. Für $\text{tRNA}_{\text{Hefe}}^{\text{Phe}}$ werden 1 000 pmol/ OD_{260} (Biltonen et al. 1978) und 1 550 pmol/ OD_{260} (Schneider et al. 1972) angegeben, während für $\text{tRNA}_{1,2}^{\text{Lys}}$ aus Hefe nur eine Angabe gefunden wurde mit 1 600 pmol/ OD_{260} (Sen und Ghosh 1973). Außerdem ist es schwierig, die theoretisch höchste Beladbarkeit zu erreichen, da die Aminoacyl-tRNA Synthetase-Präparationen nach längerem Lagern abgespaltene Aminosäuren enthalten, die die Beladbarkeit der tRNA mit ^{14}C -Aminosäure herabsetzen. Für die bei dieser Arbeit verwendeten Aminoacyl-tRNA-Synthetasen wurde festgestellt, daß direkt nach Chromatographie über Sephadex G-25 Gel zur Abtrennung von Aminosäuren eine um bis zu 30% größere Beladbarkeit der tRNA erzielt wurde.

Als weiteres Reinheitskriterium wurde das Elutionsprofil bei den Chromatographien darauf untersucht, inwieweit Extinktion und Beladbarkeit parallel laufen und ob die Peaks symmetrisch sind. Die mit diesem Kriterium erhaltenen Befunde stimmten mit den aus dem Beladungstest gewonnenen Reinheitsdaten überein.



4. Optische Messungen zur Untersuchung des Helix-Coil-Überganges von tRNA

Nukleinsäuren zeigen eine starke Absorption bei 260 nm wegen der π -Elektronensysteme der heterocyclischen Basen. In der Doppelhelix nach Watson und Crick sind diese Basen übereinander gestapelt ("Stacking"), wodurch vertikale Wechselwirkungen zwischen den heterocyclischen Ringen entstehen. Diese Wechselwirkungen bewirken eine Verkleinerung des Extinktionskoeffizienten. Mit dieser Eigenschaft des Systems läßt sich der Verlauf des "Aufschmelzens" von tRNA über die UV-Absorption verfolgen.

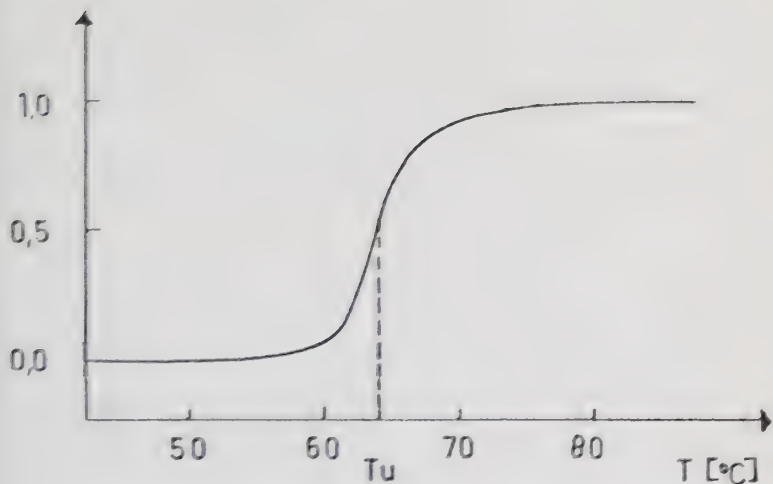


1. Bestimmung der Umwandlungsenthalpie nach van't Hoff

Zur Ermittlung der thermodynamischen Parameter kann das "Alles oder Nichts"-Modell angewendet werden (Pörschke und Eigen 1971, Martin et al. 1971, Coutts 1971). Dieses Modell basiert auf der Annahme, daß das betreffende Molekül nur in zwei energetisch voneinander verschiedene Zuständen (Helix und Coil) stabil ist, was für die tRNA allerdings nicht exakt gilt.

Unter der Annahme eines "Alles oder Nichts"-Prozesses gilt für die Helix-Coil Umwandlung die im Prinzip bereits durch van't Hoff angegebene Gleichung:





$$\left[\frac{d\theta}{dT} \right]_{T_u} = \frac{\Delta H_u}{4 R T_u^2}$$

θ = $\frac{\text{Konzentration der tRNA im Knäuel-Zustand}}{\text{Gesamtkonzentration (Helix- und Knäuel-Zustand)}}$

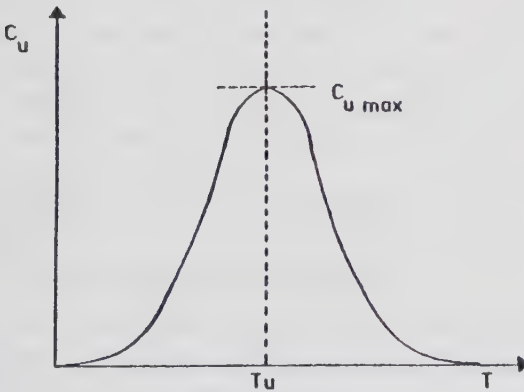
T_u = Temperatur bei der $\theta = \frac{1}{2}$ gilt (d.h. die Hälfte der Moleküle befindet sich im Knäuel-Zustand)

Zur Ermittlung von ΔH_u braucht man nur noch die normierte Steigung am Umwandlungspunkt ($\theta = \frac{1}{2}$) und T_u zu bestimmen.



Die van't Hoff-Enthalpie läßt sich auch aus den kalorimetrischen Kurven bestimmen, wenn $\frac{d\theta}{dT}$ ersetzt wird durch $C_{u \max}$ normalisiert auf die Fläche unter der Meßkurve (Ackermann und Rüterjans 1968, Privalov 1970, Ackermann 1977), wobei $C_{u \max}$ die Differenz zwischen C_u -Wert des Puffers mit und ohne tRNA am Umwandlungspunkt ist. Es folgt für einen "Alles oder Nichts"-Prozeß:

$$\Delta H_{u \text{ van't Hoff}} = \frac{4RT_u^2 (C_{u \max})}{\Delta H_{u \text{ kalorimetrisch}}}$$



Unter der Voraussetzung, daß für das "Aufschmelzen" von tRNA das Modell eines "Alles oder Nichts"-Prozesses gilt, muß die nach van't Hoff bestimmte Enthalpie mit der kalorimetrisch ermittelten Umwandlungsenthalpie für tRNA übereinstimmen. Für den Fall, daß die tRNA sich in einem nicht vollständig kooperativen Prozeß aufaltet, ergibt sich für $\Delta H_{\text{van't Hoff}}$ -auf das Gesamtmolekül bezogen- ein kleinerer Wert. Auf der Grundlage der oben beschriebenen Bestimmung der Umwandlungsenthalpie nach van't Hoff erhält man eine Enthalpie, die der in einem kooperativen Prozeß gleichzeitig aufschmelzenden Anzahl von Basenpaaren entspricht. Will man die wahren molaren Umwandlungsenthalpien messen, so muß man ein anderes Verfahren verwenden. Dafür kommen nur direkte kalorimetrische Messungen in Frage.



Um intramolekulare Wechselwirkungen der tRNA während der Messung zu verhindern, müssen die Untersuchungen in sehr verdünnten Lösungen durchgeführt werden. Dies hat zur Folge, daß der Hauptteil der bei der thermisch induzierten Helix-Knäuel-Umwandlung zugeführten Energie zur Erwärmung des Lösungsmittels verbraucht wird und die zu messende Umwandlungsenthalpie im Vergleich meist nur 1 Promille davon oder weniger beträgt. Deshalb muß mit Differenzverfahren der durch das Lösungsmittel bedingte Effekt eliminiert werden. Geräte, mit denen nach diesem Prinzip Messungen durchgeführt werden können, gibt es bis jetzt sehr wenige. Allerdings hat das große Interesse am Studium der physikalisch-chemischen Eigenschaften von Biopolymeren dazu geführt, daß in neuester Zeit hochempfindliche Differenzkalorimeter (vgl. 2.4.2.1.) serienmäßig hergestellt werden.

5. Kalorimetrische Untersuchung des Helix-Knäuel-Übergangs von tRNA

1. Wahl der geeigneten Versuchsbedingungen

Kalorimetrische Messungen sind meist an Lösungen in Phosphat-, Cacodylat- oder Citratpuffer durchgeführt worden (Privalov et al. 1975, Hinz et al. 1976 und 1977, Freire und Biltonen 1978, Bode et al. 1974). Da bei der hier beschriebenen Serie von Messungen die Konzentration an tRNA über eine Phosphatanalyse bestimmt werden sollte, konnte kein Phosphatpuffer verwendet werden. Die Messungen wurden deshalb hauptsächlich an Lösungen in Citratpuffer und teilweise auch an Lösungen in Cacodylatpuffer durchgeführt.

Durch Zusatz von Mg^{2+} -Ionen bekommt man ein mehr kooperatives, d.h. auf ein kleineres Temperaturintervall begrenztes, "Aufschmelzen" der tRNA, und damit braucht man wegen der schärferen "Signale" weniger tRNA für eine Messung einzusetzen (Nishimura und Novelli 1963, Bode et al. 1974, Privalov et al. 1975). Allerdings bedingt der Zusatz von Mg^{2+} -Ionen eine Verschiebung

des T_U -Wertes (Temperatur bei der 50% der Substanz vom Helix- in den Coil-Zustand übergegangen sind) nach höheren Temperaturen. Bei diesen höheren Temperaturen zersetzt sich die tRNA teilweise unter Katalyse von Mg^{2+} -Ionen (Hinz et al. 1977).

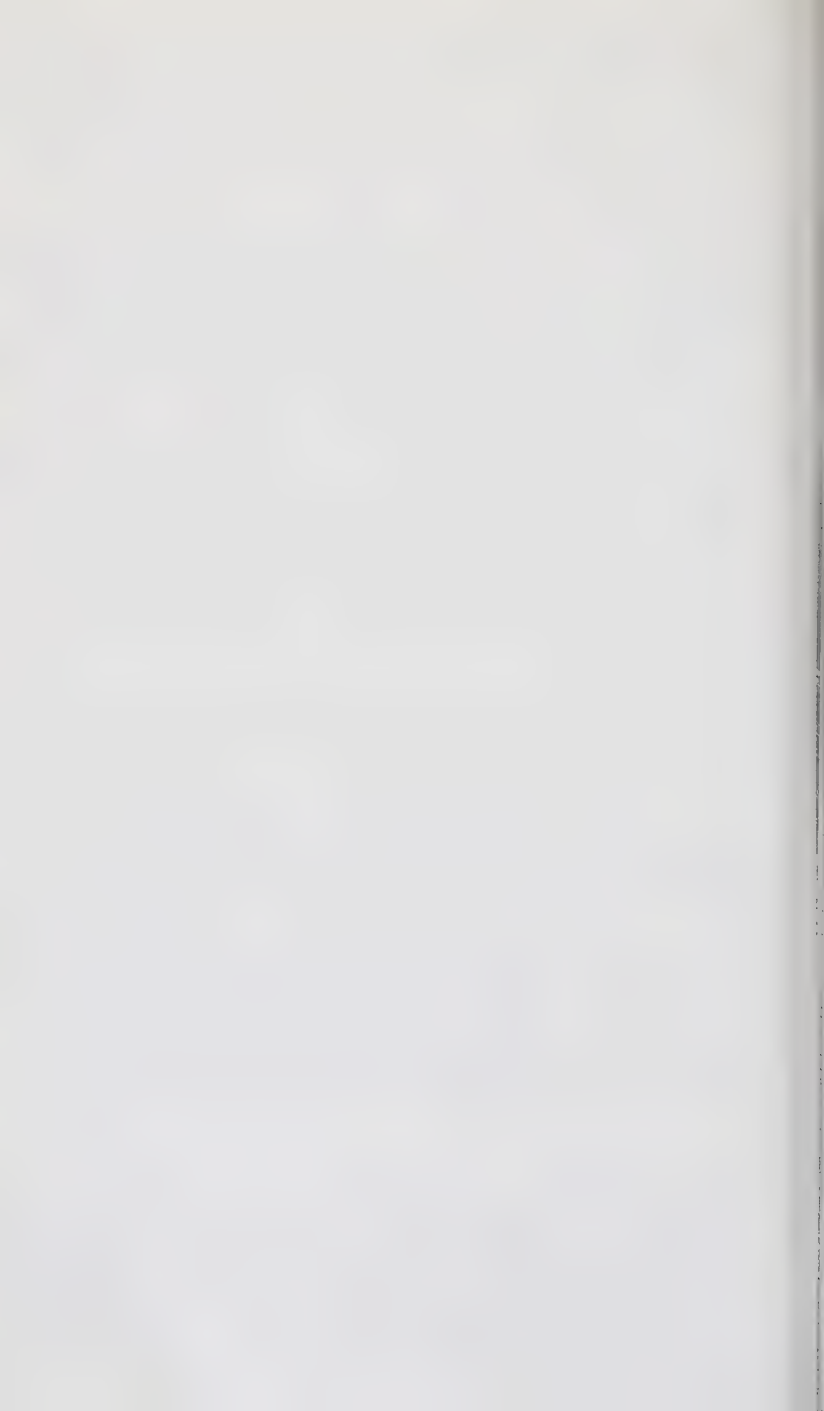
Die hohe Präzision des verwendeten Kalorimeters erlaubt es, auch bei einem breiten Umwandlungsintervall genaue Messungen durchzuführen, deshalb wurde bei den Untersuchungen teilweise auf den Zusatz von Mg^{2+} -Ionen verzichtet. Eventuell in der Lösung enthaltene Mg^{2+} -Ionen wurden durch Dialyse entfernt (2.4.2.2.).

2. Präzision der durchgeführten kalorimetrischen Messungen

Neben der Präzision des verwendeten Kalorimeters ist die Genauigkeit der Auswertung der vom Schreiber am Kalorimeter aufgezeichneten Meßkurven und der Konzentrationsbestimmung der Probe von entscheidender Bedeutung.

Bei der Bestimmung der Fläche zwischen Grundlinie und Meßkurve ist es wichtig, den durch Konvention festzulegenden Anfangs- und Endpunkt ^{x)} der Umwandlung exakt zu kennen, um so die in einer separaten Messung aufgezeichnete Grundlinie richtig anpassen zu können. Deshalb wurde parallel zu den kalorimetrischen Messungen das "Aufschmelzen" der tRNA über die Untersuchung der Änderung der Extinktion bei 260 nm verfolgt, um so eine zusätzliche Information über den Anfangs- und Endpunkt zu bekommen. Wegen der verbleibenden Unsicherheiten in der Festlegung der Grundlinie kann jedoch bei der Bestimmung der Fläche zwischen Grundlinie und Meß-

x) Streng genommen gibt es bei allen Gleichgewichten keinen "Anfangspunkt" oder "Endpunkt". In der Regel wählt man den Temperaturwert, bei dem gerade ein mit der gewählten Meßmethode noch feststellbarer Effekt auftritt, als "Anfangspunkt". Bei der Festlegung des "Endpunktes" wird analog verfahren.



kurve und der daraus folgenden Ermittlung der bei der Umwandlung umgesetzten Energie ein Fehler von $\pm 5\%$ nicht ausgeschlossen werden.

Die Konzentrationsmessung wurde mit Dreifachbestimmung über eine Phosphatanalyse durchgeführt. Die Abweichungen der Werte für eine Probe waren kleiner als $\pm 2\%$ vom Mittelwert.

Somit ergibt sich für die Messungen eine Ungenauigkeit von insgesamt ungefähr $\pm 7\%$. Das bedeutet bei der Größe der Umwandlungsenthalpien (ca. 1400 kJ/mol) von tRNAs eine Ungenauigkeit von ca. ± 100 kJ/mol.



3. Ergebnisse der kalorimetrischen Messungen

4. Kalorimetrische Messungen mit tRNA^{Phe} aus Bäckerhefe

Die Umwandlungsenthalpie von tRNA^{Phe} wurde mit Cacodylat- und Citratpuffern, die unterschiedliche Konzentrationen an Natrium- und Magnesiumchlorid enthielten, gemessen.

a) Mit 10 mM Natrium-Cacodylatpuffer pH 7,0, der 2 mmol MgCl_2 /l enthielt, ergab sich eine Umwandlungsenthalpie für tRNA^{Phe} von 1190 ± 100 kJ/mol mit $C_{u \text{ max}}$ bei 76°C (siehe Abb. 14a, c).

In Abb. 14a ist eine verkleinerte Abbildung einer Meßkurve ohne Grundlinienkorrektur zu sehen, wobei die Ordinatenwerte in μW aufgetragen sind. Bei Abb. 14c und allen weiteren Abbildungen sind die Ordinatenwerte nach der Grundlinienkorrektur auf kJ/mol grd umgerechnet.

ΔH van't Hoff aus der normierten, integrierten kalorimetrischen Kurve betrug 510 kJ/mol, während

ΔH van't Hoff berechnet aus $C_{u \text{ max}}$, normiert auf die Fläche unter der Meßkurve, 480 kJ/mol ergab.

Im gleichen Puffer, der aber noch zusätzlich 150 mmol NaCl/L enthielt, betrug die kalorimetrisch gemessene Umwandlungsenthalpie 1200 ± 100 kJ/mol mit $C_{u \text{ max}}$ bei $66,5^\circ\text{C}$ (siehe Abb. 15).

b) Für die Messungen der Umwandlungsenthalpie von tRNA^{Phe} in Magnesium freiem Puffer wurden die Lösungen wie unter 2.4.2.2. beschrieben von Mg^{2+} -Ionen befreit. Bestimmungen mit dem Atomabsorptionsspektrometer zeigten, daß die Konzentration an Mg^{2+} -Ionen nach der Dialyse kleiner als $10 \mu\text{mol/l}$, d.h. niedriger als 0,5 Mg^{2+} -Ionen pro tRNA -Molekül, war. Mit 5 mM Natrium-Citratpuffer (pH 7,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) wurde ein breites Umwandlungsintervall erhalten (siehe Abb. 16). Die Umwandlungsenthalpie betrug 1290 ± 100 kJ/mol mit $C_{u \text{ max}}$ bei $53,5^\circ\text{C}$.

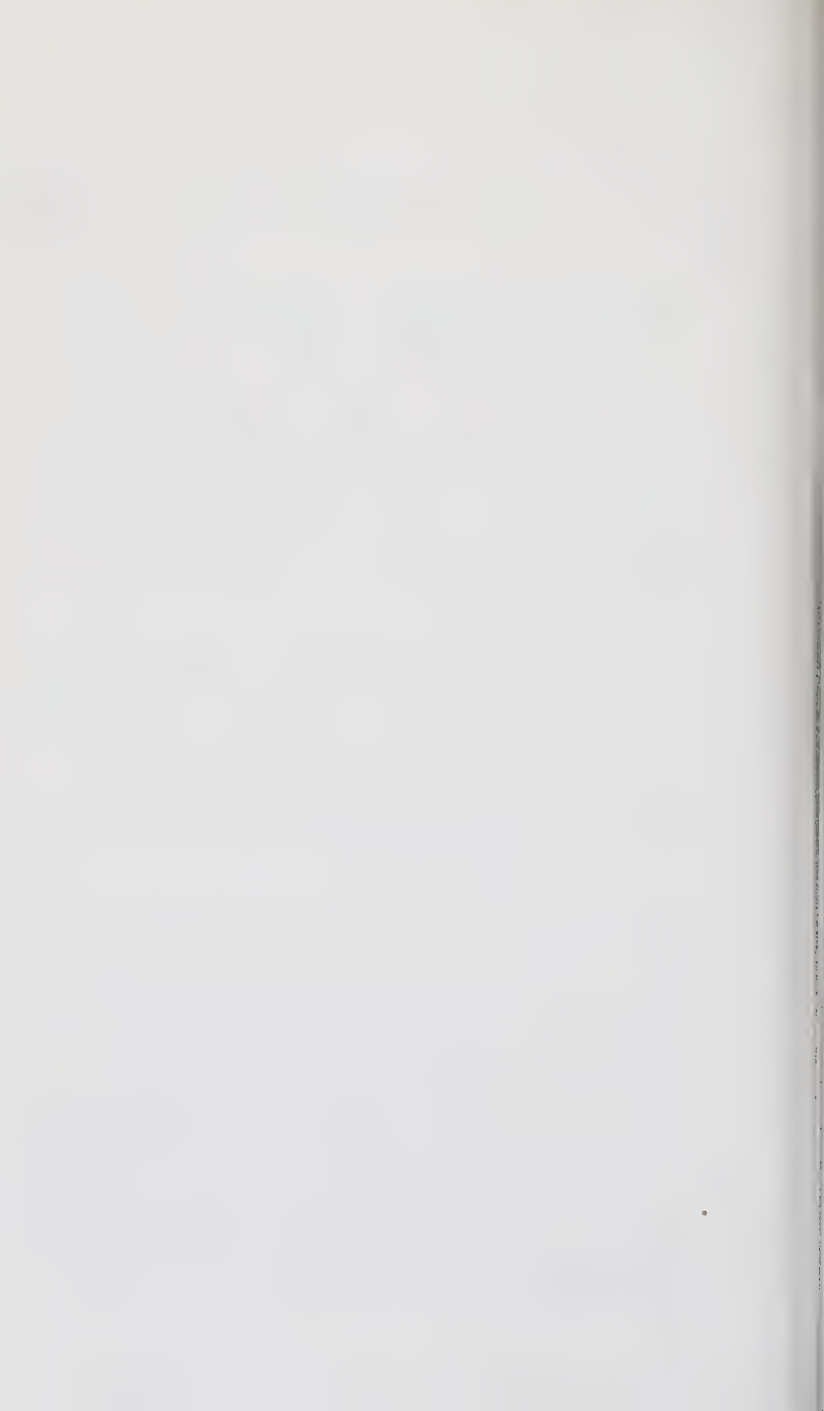
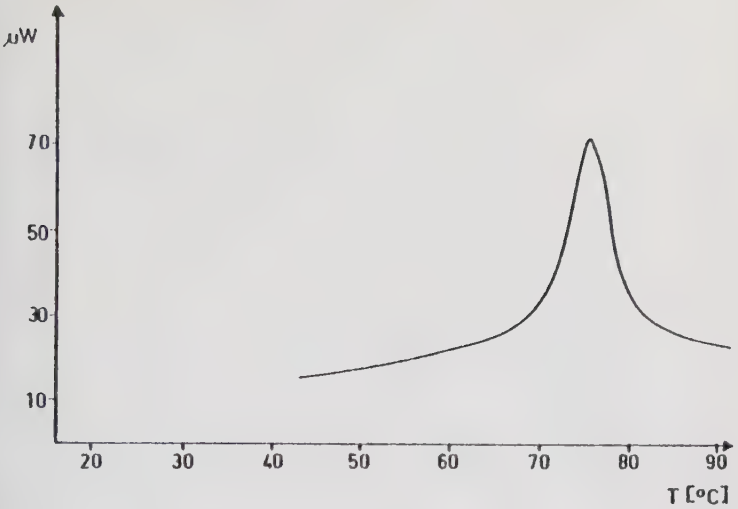
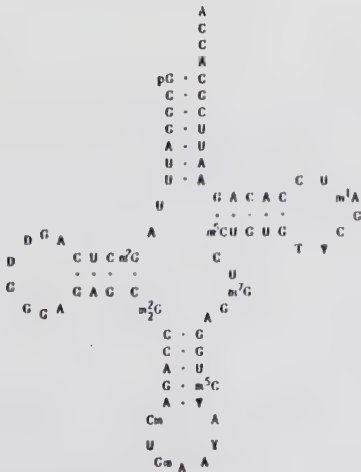


Abb. 14:



a) ——— Umwandlungskurve der tRNA^{Phe} mit
10 mM Cacodylatpuffer (pH 7,0; 2 mM MgCl₂)
(ohne Grundlinienkorrektur)



b) Struktur der tRNA^{Phe} nach dem Kleeblattmodell



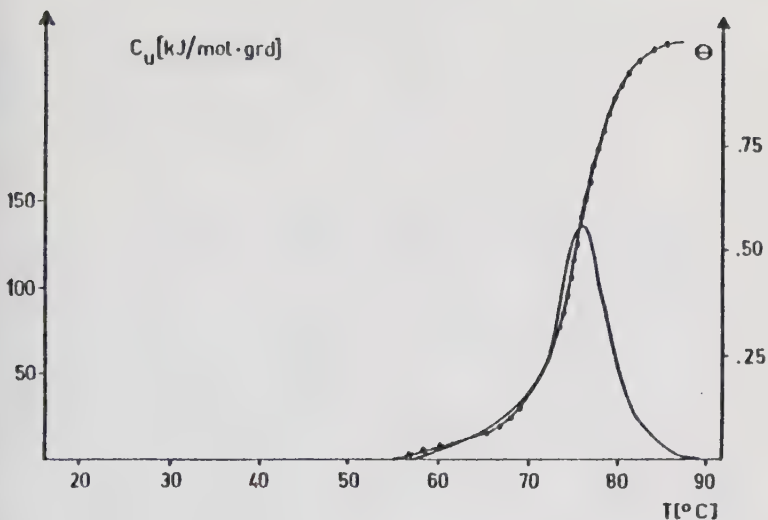


Abb. 14c:

- Umwandlungskurve der tRNA^{Phe} mit
 10 mM Cacodylatpuffer (pH 7,0; 2 mM MgCl_2)
 (mit Grundlinienkorrektur)
- Umwandlungsgrad (θ) aus der normierten
 integrierten Umwandlungskurve gewonnen

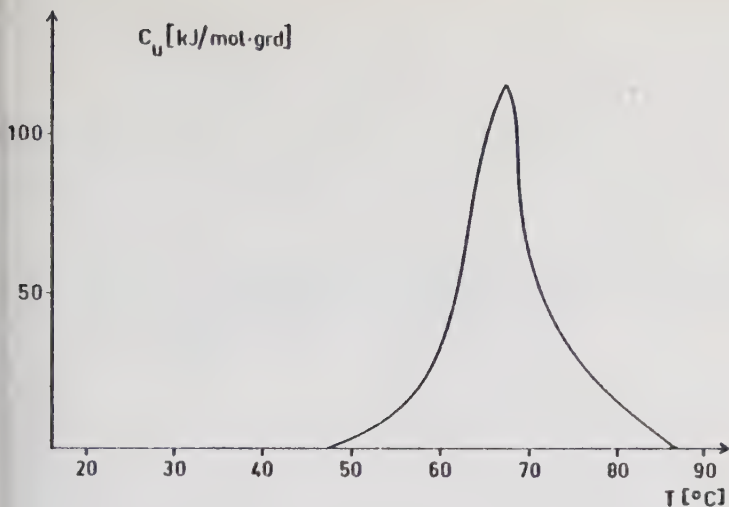
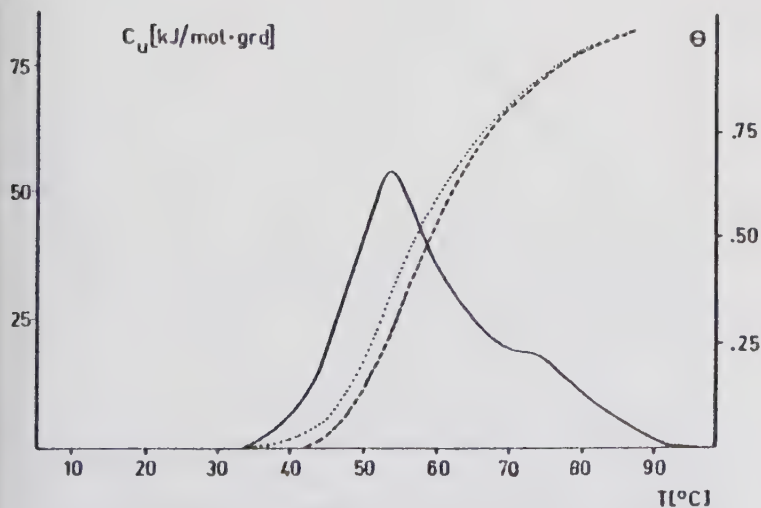


Abb. 15

Umwandlungskurve der tRNA^{Phe} mit 10 mM Cacodylatpuffer
(pH 7,0; 150 mM NaCl; 2 MgCl_2)



Umwandlungskurve der tRNA^{Phe} mit 5 mM Citratpuffer
(pH 7,0; 150 mM NaCl)

— — — — — normierte optische Umwandlungskurve

..... normierte integrierte kalorimetrische Umwandlungskurve



In Abb. 16 ist zu sehen, daß die normierte integrierte kalorimetrische Umwandlungskurve der normierten optischen Umwandlungskurve entspricht.

Mit den gleichen Puffern wurde tRNA^{Phe} der Firma Boehringer mit einer Beladbarkeit von 1400 pmol/OD₂₆₀

- das entspricht einer Reinheit von ca. 85% - untersucht. Die Umwandlungsenthalpie betrug 1350 ± 100 kJ/mol mit $C_{u \text{ max}}$ bei 55°C (siehe Abb. 17).

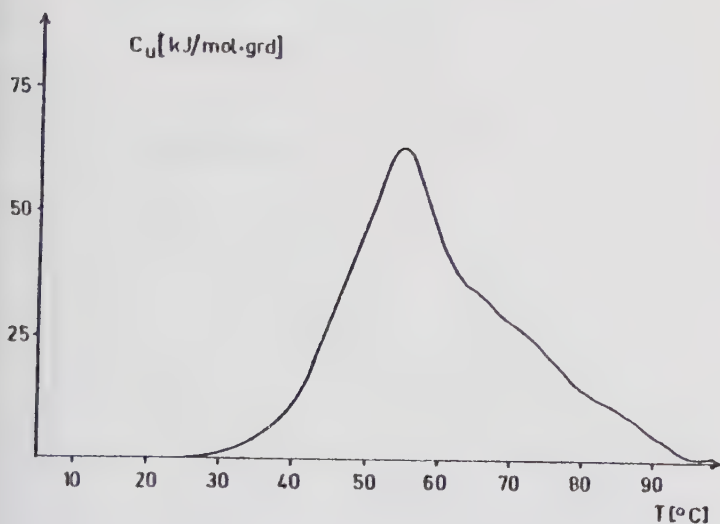


Abb. 17:

Umwandlungskurve der tRNA^{Phe} der Firma Boehringer mit 5 mM Citratpuffer (pH 7,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA)



2. Kalorimetrische Messungen an $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ aus Bäckerhefe

Die Umwandlungsenthalpie von $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ wurde in Citratpuffer gemessen.

- a) Mit 5 mM Natrium-Citratpuffer (pH 7,0, 2 mM MgCl_2 , 150 mM NaCl) ergab sich eine Umwandlungsenthalpie von 1300 ± 100 kJ/mol mit zwei ausgeprägten Maxima von C_u bei 48 und 72°C . (siehe Abb. 18a).
- b) Mit 5 mM Natrium-Citratpuffer (pH 7,0, 10 mM MgCl_2 , 150 mM NaCl) ergab sich eine Umwandlungsenthalpie von 1340 ± 100 kJ/mol mit $C_{u \text{ max}}$ bei 65°C (siehe Abb 19).

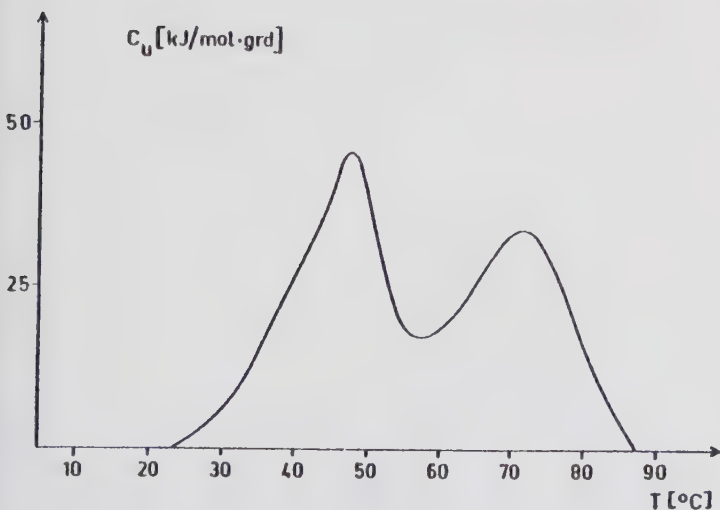


Abb. 18a:

Umwandlungskurve der $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ aus Bäckerhefe mit 5 mM Citratpuffer (pH 7,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA)

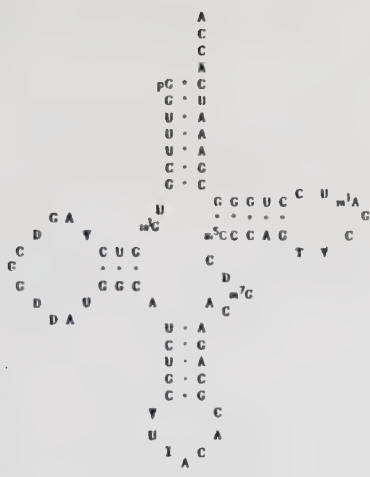


Abb. 18b:

Struktur der $tRNA_{I}^{Val}$ aus Bäckerhefe nach dem Kleeblattmodell

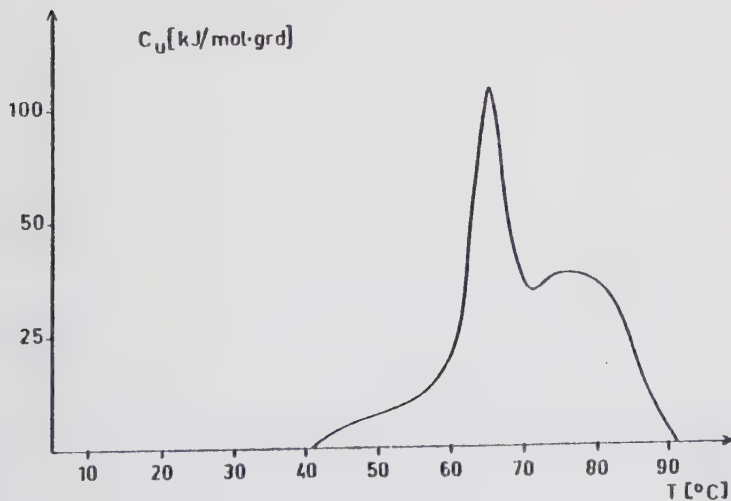


Abb. 19:

Umwandlungskurve der $tRNA_{I}^{Val}$ aus Hefe mit 5 mM Citratpuffer (pH 7,0; 150 mM NaCl; 10 mM $MgCl_2$)

6.3. Kalorimetrische Messungen an $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ aus E.coli

Die $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ wurde von der Firma Boehringer bezogen und hatte eine Beladbarkeit von $1200 \text{ pmol}/\text{OD}_{260}$, das entspricht einer Reinheit von ca. 75%. Die Untersuchungen wurden mit Cacodylatpuffer durchgeführt.

- a) Mit 10 mM Natrium-Cacodylatpuffer (pH 7,0, 2 mM MgCl_2) ergab sich eine Umwandlungsenthalpie von $1510 \pm 100 \text{ kJ/mol}$ mit $C_{u \text{ max}}$ bei 82°C (siehe Abb. 20a).
- b) Mit 10 mM Natrium-Cacodylatpuffer (pH 7,0, 2 mM MgCl_2 , 150 mM NaCl) war die Umwandlungsenthalpie $1480 \pm 100 \text{ kJ/mol}$ mit $C_{u \text{ max}}$ bei 72°C (siehe Abb. 21).

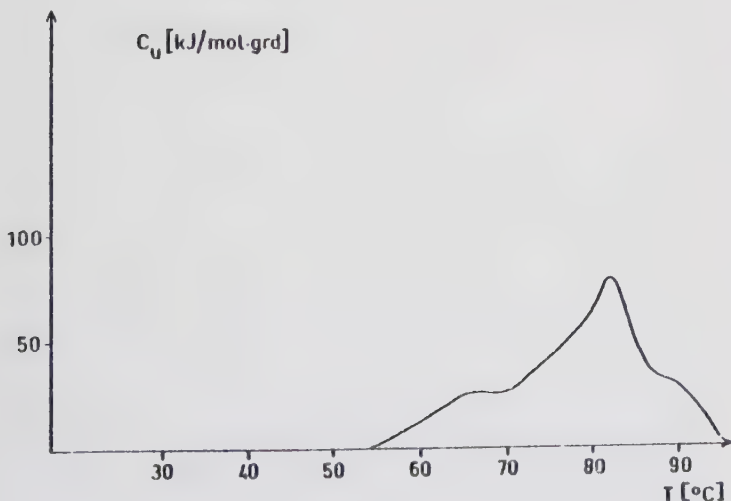


Abb. 20a:

Umwandlungskurve der $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ (E.coli) mit 10 mM Cacodylatpuffer (pH 7,0; 2 mM MgCl_2)

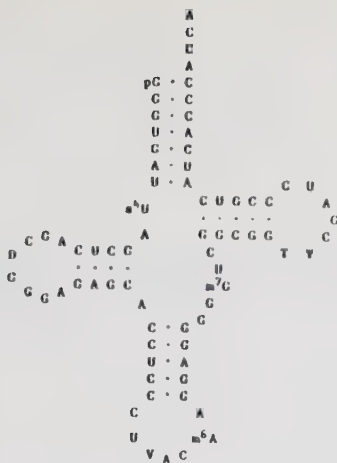


Abb. 20b:

Struktur der $tRNA_1^{Val}$ (E.coli) nach dem Kleeblattmodell

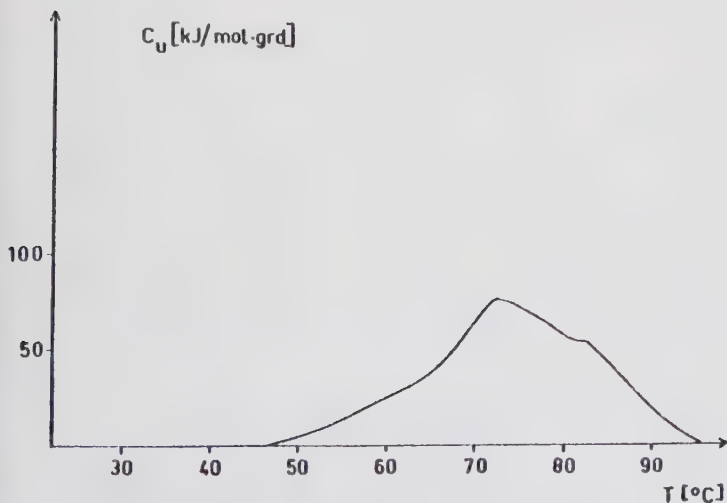


Abb. 21:

Umwandlungskurve der $tRNA_1^{Val}$ (E.coli) mit 10 mM Cacodylatpuffer (ph 7,0; 150 mM NaCl; 2 mM $MgCl_2$)

3.6.4. Kalorimetrische Messungen an tRNA^{Lys} aus Bäckerhefe

Mit 5 mM Natrium-Citratpuffer (pH 7,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) betrug die Umwandlungsenthalpie für tRNA₂^{Lys} 1150 ± 100 kJ/mol mit $C_{u \max}$ bei 51°C (siehe Abb. 22a).

Mit dem gleichen Puffer wurde die Umwandlungskurve für tRNA₁^{Lys} gemessen (siehe Abb 23). $C_{u \max}$ lag bei 48°C.

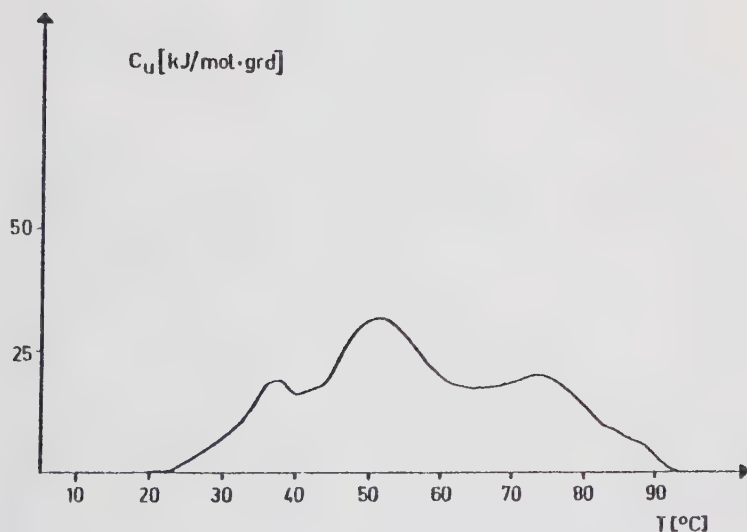


Abb. 22a:

Umwandlungskurve der tRNA₂^{Lys} mit 5 mM Citratpuffer
(pH 7,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA)

5. Kalorimetrische Messungen an tRNA^{Tyr} aus E.coli

Hochreine tRNA^{Tyr} wurde freundlicherweise von Herrn Dr. G. Kraus, Medizinische Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt.

Die Messungen wurden in magnesiumhaltigem Cacodylat-Puffer mit und ohne Zusatz von Natriumchlorid gemessen.

- a) Mit 10 mM Cacodylatpuffer (pH 7,0, 2 mM MgCl₂) betrug die Umwandlungsenthalpie 1620 ± 100 kJ/mol mit $C_{u \text{ max}}$ bei 77°C und mit einem Plateau für C_u von 84 - 90°C (siehe Abb. 24a).
- b) Mit dem gleichen Puffer, aber bei Zusatz von 150 mmol NaCl/l, betrug die Umwandlungsenthalpie 1640 ± 100 kJ/mol mit $C_{u \text{ max}}$ bei 68°C (siehe Abb. 25).

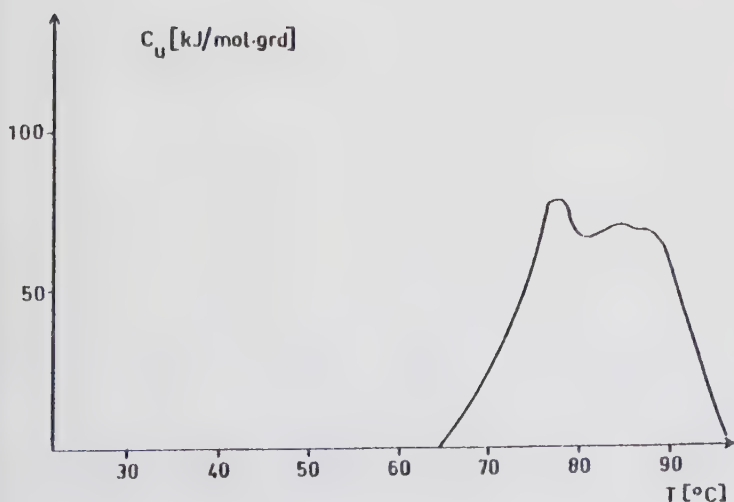


Abb. 24 a:

Umwandlungskurve der tRNA^{Tyr} mit 10 mM Cacodylatpuffer
(pH 7,0; 2 mM MgCl₂)

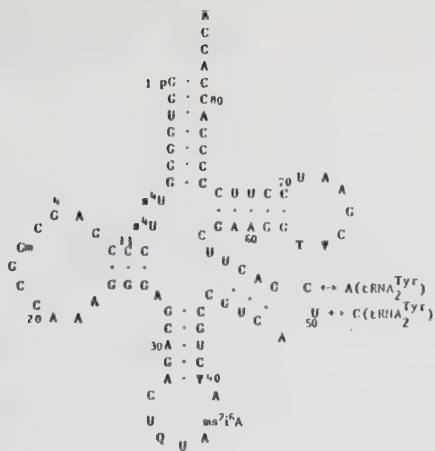


Abb. 24b:

Struktur der $tRNA^{Tyr}$ nach dem Kleeblattmodell

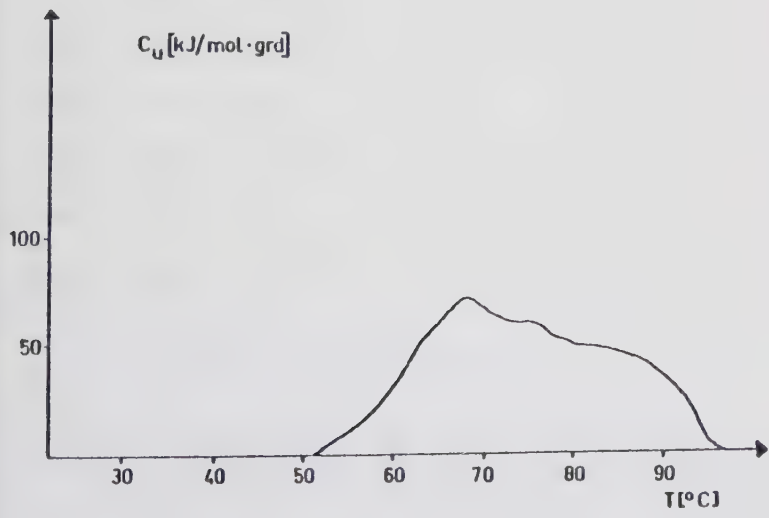


Abb. 25:

Umwandlungskurve der $tRNA^{Tyr}$ mit mM Cacodylatpuffer
(pH 7,0, 150 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$)

5.6. Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der kalorimetrischen Messungen

Tabelle 1:

	Umwandlungs- enthalpie [kJ/mol]	C _u max [°C]	Puffer
tRNA ^{Phe} Hefe	1190 ± 100	76	A
tRNA ^{Phe} Hefe	1200 ± 100	66,5	B
tRNA ^{Phe} Hefe	1290 ± 100	53,5	C
tRNA ^{Phe} Hefe ^{x)}	1350 ± 100	55	C
tRNA ^{Val} ₁ Hefe	1300 ± 100	48/72	D
tRNA ^{Val} ₁ Hefe	1340 ± 100	65	E
tRNA ^{Val} ₁ E.coli	1510 ± 100	82	A
tRNA ^{Val} ₁ E.coli	1480 ± 100	72	B
tRNA ^{Lys} ₂ Hefe	1150 ± 100	51	C
tRNA ^{Tyr} E.coli	1620 ± 100	77/87	A
tRNA ^{Tyr} E.coli	1640 ± 100	68	B

x) von der Firma Boehringer bezogen

A: 10 mM Cacodylatpuffer (pH 7,0, 2 mM MgCl₂)

B: 10 mM Cacodylatpuffer (pH 7,0, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂)

C: 5 mM Citratpuffer (pH 7,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)

D: 5 mM Citratpuffer (pH 7,0, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂)

E: 5 mM Citratpuffer (pH 7,0, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂)

.7. Diskussion der Ergebnisse

.1. Zur tRNA^{Phe}

Die Umwandlungsenthalpie für tRNA^{Phe} mit magnesiumhaltigem Puffer von 1190 bzw. 1200 kJ/mol ist etwas kleiner als der Wert von 1290 kJ/mol ohne Magnesium. Aus der Literatur ist bekannt (Hinz et al. 1977, Privalov und Filimonov 1978), daß der Zusatz von Magnesium keine über die Fehlergrenze der Messungen hinausgehende Änderung der Umwandlungsenthalpie ergibt. Der Unterschied von 100 kJ/mol zwischen den Umwandlungsenthalpien mit und ohne Magnesium liegt nämlich im Bereich der Fehlerbreite. Dazu kommt, daß bedingt durch das unterschiedliche Umwandlungsintervall sich eine etwas unterschiedliche Genauigkeit der Bestimmung der Umwandlungsenthalpie ergibt. Die Beimengung anderer tRNAs mit einer etwas größeren Umwandlungsenthalpie in der tRNA von Boehringer ist als Erklärung für die größere Umwandlungsenthalpie von 1350 kJ/mol denkbar. Aus den Kalorigrammen (Abb. 16 und 17) ist zu ersehen, daß die tRNA^{Phe} der Firma Boehringer unter sonst gleichen Bedingungen ein breiteres Umwandlungsintervall als die in dieser Arbeit isolierte tRNA^{Phe} hat. Auch ist die Schulter nach dem Maximum für C_U nicht so deutlich zu sehen. Beides deutet auf die geringere Reinheit der von Boehringer bezogenen tRNA^{Phe} hin.

Für tRNA^{Phe} von Boehringer sind bisher Umwandlungsenthalpien von 1247 ± 63 kJ/mol (Hinz et al. 1977) und 1050 kJ/mol (Freire und Biltonen 1978) kalorimetrisch bestimmt worden. Während der Wert von Hinz et al. (1977) innerhalb der Fehlergrenze mit dem Wert aus dieser Arbeit für tRNA^{Phe} der Firma Boehringer übereinstimmt, ist der von Freire und Biltonen (1978) bestimmte Wert etwas kleiner. Mit dem von Freire und Biltonen benutzten Kalorimeter ist es nicht möglich gewesen, die vollständige Umwandlungskurve aufzunehmen, wodurch der niedrigere Wert erklärt werden könnte.

Für hochreine tRNA^{Phe} ist eine Umwandlungsenthalpie von 1004 kJ/mol gemessen worden (Bode et al. 1974). Dieser Wert liegt deutlich unter dem Mittelwert der in der vorliegenden Arbeit bestimmten Umwandlungsenthalpie von 1230 kJ/mol für hochreine tRNA^{Phe}. Eine mögliche Erklärung kann die unterschiedliche Empfindlichkeit der verwendeten adiabatischen Kalorimeter sein. Darauf deutet auch die höhere Umwandlungsenthalpie von 1250 kJ/mol hin, die Bode mit derselben tRNA über Mischungskalorimetrie bestimmt hat (Bode Dissertation 1973).

Die einzelnen Helixabschnitte der tRNA können in der Regel erst "aufschmelzen", wenn die Tertiärstruktur aufgefaltet ist (Vgl. z.B. Privalov und Filimonov 1978). Wird die Tertiärstruktur durch Mg²⁺-Ionen stabilisiert, so können sich auch die weniger stabilen tRNA-Bereiche erst bei höherer Temperatur auffalten. Dadurch wird eine mehr kooperative Umwandlung erreicht.

Wie in Abb. 14b zu sehen ist, hat die tRNA^{Phe} bei Magnesium-Zusatz ein kleineres Schmelzintervall, d.h. eine kooperativere Umwandlung.

Die Berechnung der van't Hoff-Enthalpie ergab, daß auch unter Zusatz von Magnesium-Ionen keine vollkommen kooperative Umwandlung erreicht wurde. Sowohl bei der Bestimmung der van't Hoff-Enthalpie über $d\theta/dt$ wie auch bei der Bestimmung über $C_{u \max}$ war der Wert kleiner als 50% der kalorimetrisch bestimmten Enthalpie.

7.2. Zur $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ aus Bäckerhefe

Die für $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ gemessenen Umwandlungsenthalpien liegen mit 1300 bzw. 1340 kJ/mol erheblich unter dem von Privalov (Privalov et al. 1975) gemessenen Wert (1554 kJ/mol). Nach Korrektur des für die Konzentrationsbestimmung verwendeten Extinktionskoeffizienten für $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ um 10% (Hinz et al. 1977) ist eine Umwandlungsenthalpie von 1393 kJ/mol angegeben worden. Um diese Unterschiede der Angaben über die Extinktionskoeffizienten zu klären, wurde eine Phosphatanalyse durchgeführt. Für den Extinktionskoeffizienten von $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ in 5 mM Natrium-Citrat-Puffer (pH 7,0, 150 mM NaCl) ergab sich ein Wert von $5,45 \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{mol}$.

Dagegen beträgt der von Privalov (Privalov et al. 1975) verwendete Extinktionskoeffizient $5,93 \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{mol}$. Der um 10% erniedrigte Extinktionskoeffizient stimmt besser mit dem über die Phosphatanalyse gemessenen Extinktionskoeffizienten überein. Die mit diesem kleineren Extinktionskoeffizienten berechnete Umwandlungsenthalpie von 1393 kJ/mol (Hinz et al. 1977) ist im Rahmen der Meßgenauigkeit in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit ermittelten Werten von 1300 bzw. 1340 kJ/mol.

Beim Vergleich der kalorimetrischen Umwandlungskurven, die mit Citratpuffer, der 2 mM MgCl_2 bzw. 10 mM MgCl_2 enthielt, gemessen wurden, kann man deutlich sehen, daß bei der größeren Konzentration an Magnesiumionen die Umwandlung erst bei höherer Temperatur beginnt.

Die normierte optische Umwandlungskurve für $\text{tRNA}_1^{\text{Val}}$ in 5 mM Natrium-Citratpuffer (pH 7,0, 2 mM MgCl_2 , 150 mM NaCl) entspricht nicht vollständig der normierten integrierten kalorimetrischen Umwandlungskurve.

Die Abweichungen brauchen nicht durch die Struktur der tRNA bedingt zu sein, sondern können aus den Unsicherheiten der Auswertung beim Vergleich dieser beiden unterschiedlichen Methoden herrühren.

Deshalb muß auf eine weiterführende Diskussion über strukturelle Besonderheiten als mögliche Ursache der Abweichungen verzichtet werden.

7.3. Zur tRNA^{Val}₁ aus E.coli

Die über einen Beladungstest (2.3.2.1.) ermittelte spezifische Reinheit der von der Firma Boehringer bezogenen tRNA^{Val}₁ betrug 75%. Da die verschiedenen tRNAs ähnliche Umwandlungsenthalpien haben, ergibt die etwas geringere Reinheit keinen sehr großen Fehler. Selbst wenn alle tRNAs, die als Beimengungen vorhanden sind, eine um 25% in die gleiche Richtung abweichende Umwandlungsenthalpie hätten, was äußerst unwahrscheinlich ist, würde sich nur ein Fehler von knapp 6% ergeben. Deshalb wurde die tRNA^{Val}₁ ohne weitere Aufreinigung zur kalorimetrischen Messung verwendet.

Ein Vergleich der beiden kalorimetrischen Bestimmungen an tRNA^{Val}₁ mit Cacodylatpuffer, der jeweils 2 mmol MgCl₂/l aber einmal noch zusätzlich 150 mmol NaCl/l enthielt, zeigt, daß der Zusatz von NaCl die Umwandlungsenthalpie nicht merklich beeinflusst (1480 statt 1510 kJ/mol). Dagegen wird die Kooperativität der Umwandlung herabgesetzt und C_u max nach niedrigerer Temperatur verschoben (vergl. Privalov et al. 1975). Die zugesetzten monovalenten Na⁺-Ionen können an die Stelle der divalenten Mg²⁺-Ionen, die die Tertiärstruktur durch intramolekulare Verbrückung der Phosphatgruppen stabilisieren, treten, wobei die Verbrückung aufgehoben wird. Dadurch ergibt sich eine geringere Stabilität der Tertiärstruktur und damit eine kleinere Kooperativität der Umwandlung (siehe 3.7.1.).

7.4. Zur tRNA^{Lys} aus Bäckerhefe

Wie aus Abbildung 22a zu entnehmen ist, hat die tRNA^{Lys}₂ ein sehr breites Umwandlungsintervall mit drei deutlich erkennbaren Maxima für C_u.

Der Wert von 1150 kJ/mol für die Umwandlungsenthalpie liegt niedriger als der Mittelwert von tRNA^{Val}₁ aus Hefe. Betrachtet man nun die in der Sekundärstruktur vorhandenen Basenpaare und nimmt an, daß ein AU- und ein AY-Basenpaar und ein GU- und ein GY-Basenpaar jeweils einen vergleichbaren Beitrag zur Stabilität der tRNA liefern (Privalov und Filimonov 1978), so ist zu sehen, daß tRNA^{Lys}₂ bei gleicher Anzahl an GC-Paaren ein AU-Paar mehr als tRNA^{Val}₁ in der Sekundärstruktur besitzt. Eine mögliche Erklärung für die trotzdem kleinere Umwandlungsenthalpie der tRNA^{Lys}₂ ist die unterschiedliche Anordnung der helikalen Bereiche in den beiden tRNAs. tRNA^{Val}₁ (siehe Abb. 22b) gehört zu der Klasse D₃V₅ (Erklärung der tRNA-Klassen siehe Abb.1) während tRNA^{Lys}₂ wie auch tRNA^{Phe} und tRNA^{Val}₁ aus E.coli (siehe Abb. 22b, 14b, 20b) der Klasse D₄V₅ zuzurechnen sind.

Die mit tRNA^{Lys}₂ in Magnesium-Ionen-freier Lösung durchgeführten Umwandlungen waren genauso wie mit tRNA^{Phe} vollständig umkehrbar. Die beim "Aufschmelzen" der tRNA registrierte größere Extinktion ging beim Abkühlen der Probe auf ihren Ausgangswert zurück. Bei Wiederholung des "Schmelzvorganges" wurde die gleiche Hyperchromizität erreicht (vergl. auch 3.5.1.). tRNA^{Lys}₁, die im Verlaufe der Aufreinigung von tRNA^{Lys}₂ aus dem Gemisch der für Lysin spezifischen isoakzeptierenden tRNAs abgetrennt werden mußte, wurde ebenfalls kalorimetrisch untersucht. Da die Menge an isolierter tRNA^{Lys}₁ nicht ausreichte, um eine genaue Bestimmung der Umwandlungsenthalpie vorzunehmen, ist in Abbildung 23 nur die qualitative kalorimetrische Umwandlungskurve angegeben. Für tRNA^{Lys}₁ ist keine Primärstruktur bekannt

und deshalb ist ein Vergleich der Struktur mit den übrigen tRNAs nicht möglich. Darum wurde darauf verzichtet, eine für die Bestimmung der Umwandlungsenthalpie genügende Menge an tRNA^{Lys}₁ zu isolieren.

7.5. Zur tRNA^{Tyr} aus E.coli

Die untersuchte tRNA^{Tyr} war ein Gemisch der verschiedenen für Tyrosin spezifischen isoakzeptierenden tRNAs. Wie aus Abbildung 24b ersichtlich ist, unterscheiden sich die tRNAs in ihrer Primärstruktur nur ganz unwesentlich. Keine der zwei Basen, durch die sich die Primärstrukturen unterscheiden, ist bei der Anordnung nach dem Kleeblattmodell in einer Basenpaarbildung involviert.

Die Umwandlungsenthalpie für tRNA^{Tyr} ist erheblich größer als für die anderen untersuchten tRNAs. Dieser Befund ist auch bei dem hohen Gehalt an GC-Basenpaaren zu erwarten, er steht aber in einem gewissen Widerspruch zu dem niedrigeren Wert von 1320 kJ/mol, den Hinz (Hinz et al. 1976) für tRNA^{Ser}₂ aus Hefe bestimmt hat. tRNA^{Ser}₂ besitzt ebenfalls einen ausgedehnten Extra-Loop und weist in der Kleeblattanordnung mit 24 Basenpaaren noch ein Basenpaar mehr auf als die tRNA^{Tyr}. Das Argument (Hinz et al. 1976), daß ein Extra-Loop die Struktur der tRNA destabilisiert und so der überraschend niedrige Wert der Umwandlungsenthalpie für tRNA^{Ser}₂ erklärt werden kann, trifft für die tRNA^{Tyr} nicht voll zu. Der Einfluß des Extra-Loop auf die Struktur der tRNA^{Tyr} ist sicherlich kleiner, da die tRNA^{Tyr} nur zwei GC-Paare und ein AU-Basenpaar -im Vergleich zu vier GC-Basenpaaren bei der tRNA^{Ser}₂- im Extra-Loop aufweist.

3.8. Diskussion der Aussagen aus den kalorimetrischen Messungen zur Struktur der tRNA

Beim Vergleich der kalorimetrischen Umwandlungskurven der verschiedenen tRNAs fallen zunächst die großen Unterschiede auf. Dies ist umso bemerkenswerter, als nach der Röntgenstrukturanalyse von tRNA^{Phe} (vergl. 1.2.) für alle übrigen tRNAs eine vergleichbare Struktur postuliert wurde (Rich 1977, Holbrook et al. 1978). Gestützt wird diese Annahme unter anderem auch durch NMR-Untersuchungen (Reid und Hurd 1977) an 14 verschiedenen tRNAs mit jeweils vier Basenpaaren im D-Stamm und fünf Basen im variablen Loop (tRNA-Klasse D_{4V5}), die ergeben haben, daß sie eine mit der tRNA^{Phe} vergleichbare Tertiärstruktur haben. Ein weiterer Hinweis auf eine vergleichbare Tertiärstruktur aller tRNAs ergibt sich dadurch, daß alle Basen, die an den tertiären Basenpaaren^{x)} in der tRNA^{Phe} beteiligt sind, bei allen anderen bisher sequenzierten tRNAs entweder an den gleichen Stellen vorkommen oder semivariant sind, d.h. G kann durch A (Purine) und U durch C (Pyrimidine) ersetzt sein (Kim 1978). Der scheinbare Widerspruch zwischen den doch sehr unterschiedlichen kalorimetrischen Umwandlungskurven, die offenbar hauptsächlich die Unterschiede der Sekundärstruktur widerspiegeln, und einer nach der Röntgenstrukturanalyse und NMR-Untersuchungen sehr ähnlichen Tertiärstruktur für alle tRNAs läßt sich leicht lösen, wenn man bedenkt, daß die Röntgenstrukturanalyse nur Daten über die Abstände der einzelnen Atome zueinander aufzeigt. Wie groß die energetischen Wechselwirkungen sind, kann dabei nicht ohne weiteres angegeben werden, da es sich um Wechselwirkungen verschiedener Art handelt, deren Ausmaß nicht allein aus dem Abstand errechnet werden kann. Kleine Abweichungen in der Struktur oder Art der Wechselwirkung können auf die Energie der Wechselwirkungen einen entscheidenden Einfluß haben.

^{x)} d.h. Basenpaare, die nur in der Tertiärstruktur zusätzlich auftreten

Die sehr unterschiedlichen kalorimetrischen Umwandlungskurven auch für tRNAs mit sehr ähnlicher Gesamtzahl der Basenpaare in der Sekundärstruktur wie z.B. tRNA^{Phe} aus Hefe und tRNA^{Lys}₂ aus Hefe, die je 12 GC-, je ein GU- und acht bzw. 7 AU, Υ -Basenpaare haben (siehe Abb. 14b und 22b), können damit erklärt werden, daß die GC-Basenpaare, die einen größeren Beitrag zur Stabilisierungsenergie liefern, unterschiedlich auf die einzelnen helikalen Bereiche der beiden tRNAs verteilt sind.

Sehr gut ist zu erkennen, daß die tRNA^{Tyr}, bei der sechs GC-Paare im Akzeptor-Stamm vorhanden sind (siehe Abb. 24b), unterhalb einer Temperatur von 92°C noch nicht vollständig "aufgefaltet" ist, während die tRNA^{Phe}, bei der in keinem helikalen Bereich mehr als drei GC-Basenpaare vorkommen, schon um 80°C "aufgeschmolzen" ist.

In Abb. 26 sind die Umwandlungsenthalpien der einzelnen tRNAs in Abhängigkeit von der in der Sekundärstruktur vorkommenden Anzahl an H-Brücken aufgezeichnet. Dabei wurden pro GC-Paar drei H-Brücken pro AU-Paar bzw. A Υ -Paar je zwei H-Brücken und pro GU- bzw. G Υ -Paar je eine H-Brücke berechnet. Die Abb. 26 zeigt deutlich einen Zusammenhang zwischen der durch das Kleeblattmodell beschriebenen Sekundärstruktur und der Stabilität der einzelnen tRNAs: je größer die Anzahl der H-Brücken in der Sekundärstruktur ist, desto größer ist die Umwandlungsenthalpie. Dieser Zusammenhang tritt in Abb. 3, wo die aus der Literatur bekannten Umwandlungsenthalpien für tRNAs in analoger Weise aufgetragen worden sind, nicht so deutlich hervor.

Der nicht lineare Zusammenhang ergibt, daß die Stabilität der tRNAs nicht allein durch die Anzahl der H-Brücken in der Sekundärstruktur und der damit verbundenen Stapelenthalpie bedingt wird, sondern noch zusätzliche Wechselwirkungen vorhanden sein müssen.

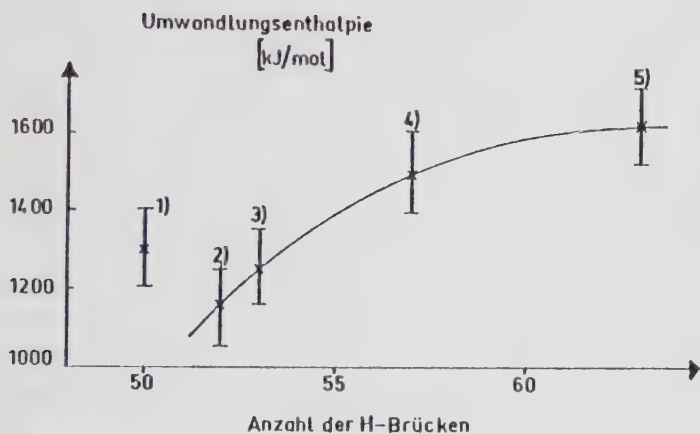


Abb. 26:

Die Umwandlungsenthalpien der untersuchten tRNAs sind in Abhängigkeit von der Anzahl H-Brücken in der Sekundärstruktur aufgezeichnet (siehe 3.8).

1) $tRNA_1^{Val}$ aus Hefe

2) $tRNA_2^{Lys}$ aus Hefe

3) $tRNA^{Phe}$ aus Hefe

4) $tRNA_1^{Val}$ aus *E.coli*

5) $tRNA^{Tyr}$ aus *E.coli*

Die Stabilisierungsenthalpie für die Sekundärstruktur läßt sich im Prinzip aus den thermodynamischen Daten für die einzelnen Basenpaare berechnen. Die kalorimetrische Bestimmung der Basenpaarungsenthalpien für ein GC- oder AU-Paar ist mit Schwierigkeiten verbunden, da doppelsträngige RNA aus Poly GC, mit der eine solche Bestimmung möglich wäre, einen sehr hohen "Schmelzpunkt" hat. Will man die Basenpaarungsenthalpie für AU aus Messungen an der doppelsträngigen RNA aus Poly A und Poly U gewinnen, so muß die Stapelenthalpie für das "aufgeschmolzene" Poly A, das eine Helix bildet, mit berücksichtigt werden. In einer neueren Arbeit (Filimonov und Privalov 1978) wurde kalorimetrisch der Wert zu 40 kJ/mol bestimmt. Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit dem von Neumann (Neumann und Ackermann 1969) gefundenen Wert.

Um die Größe der Basenpaarungsenthalpie für ein GC-Paar abzuschätzen, kann der aus optischen Untersuchungen indirekt gewonnene Wert für ein GC-Paar mit 54 kJ/mol (Gralla und Crothers 1973) und der aus kalorimetrischen Untersuchungen an tRNA abgeschätzte Wert mit 60 kJ/mol (Privalov und Filimonov 1978) herangezogen werden. Da der Wert von 60 kJ/mol pro GC-Basenpaar etwas zu hoch sein dürfte, wurde für die folgende Abschätzung der Stabilisierung der tRNA durch die Sekundärstruktur ein Wert von 55 kJ/mol GC-Basenpaar verwendet.

AY- und GU-Basenpaare kommen in der Sekundärstruktur nicht häufig vor, deshalb ist deren Beitrag an der Gesamtstabilisierung der tRNA nicht von entscheidender Bedeutung, und es können die nur abgeschätzten Werte (Privalov und Filimonov 1978) mit 40 bzw. 30 kJ/mol ohne Korrektur verwendet werden.

In Tabelle 2 sind die gemittelten, kalorimetrisch gemessenen Umwandlungsenthalpien, die für die Sekundärstruktur berechneten Stabilisierungsenthalpien und deren Differenz für die untersuchten tRNAs aufgeführt.

Tabelle 2 :

Es sind die kalorimetrisch gemessenen Umwandlungsenthalpien (ΔH_{kal}), die mit den Inkrementen abgeschätzten Umwandlungsenthalpien (ΔH_{ber}) und deren Differenz für die untersuchten tRNAs angegeben. (nähere Erläuterungen im obigen Text)

		ΔH_{kal} [kJ/mol]	ΔH_{ber} [kJ/mol]	$\Delta H_{kal} - \Delta H_{ber}$ [kJ/mol]
tRNA ^{Phe}	Hefe	1250	1010	240
tRNA ^{Val} ₁	Hefe	1350	940	410
tRNA ^{Val} ₁	E.coli	1490	1055	435
tRNA ^{Lys} ₂	Hefe	1150	1000	150
tRNA ^{Tyr}	E.coli	1630	1175	455

Die für die Sekundärstruktur nach dem oben skizzierten Verfahren mit Inkrementen abgeschätzte Stabilisierungsenthalpie ist außer für tRNA^{Lys}₂ um ca. 20 - 30% kleiner als die tatsächlich gemessenen Umwandlungsenthalpie. Der Unterschiedsbetrag ist eher noch größer, da die für die Berechnung angesetzten Werte der Basenpaarungsenthalpie eher zu groß sind und außerdem in der Berechnung nicht berücksichtigt ist, daß Basenpaare, die am Ende einer Helix stehen, einen geringeren Beitrag

zur Stapelenthalpie liefern. Auch die Basenpaare, die direkt neben einem Loop angeordnet sind, tragen ebenfalls einen kleineren Betrag als den in die Berechnung eingesetzten Betrag zur Stabilisierung der Struktur bei. Der Differenzbetrag zwischen abgeschätzter und tatsächlich gemessener Umwandlungsenthalpie muß den Wechselwirkungen zugerechnet werden, die die Tertiärstruktur stabilisieren. Daraus kann geschlossen werden, daß die tRNA auch in Lösung zusätzlich zur Sekundärstruktur noch weitere die Struktur stabilisierende Wechselwirkungen aufweist. Inwieweit diese durch die Röntgenstrukturanalyse des kristallinen Zustandes der tRNA^{Phe} bekannten Struktur entsprechen, kann aus den kalorimetrischen Daten allein nicht entnommen werden. Aber die Abschätzung der Stabilisierungsenthalpie unter Heranziehung der im kristallinen Zustand zusätzlich zur Sekundärstruktur gefundenen 20 H-Brücken zwischen den Basen ist im Einklang mit dem durch kalorimetrische Untersuchungen erhaltenen Wert von durchschnittlich 350 kJ/mol, der sich als Differenz zwischen der für die Sekundärstruktur berechneten und der tatsächlich gemessenen Umwandlungsenthalpie ergeben hat (siehe Tab. 2).

Von großer Bedeutung für die Strukturaufklärung längerer tRNA-Moleküle -wie 5S RNA oder Virode- sind die thermodynamischen Daten für die Strukturelemente, die sich bei Zusammenlagerung von einzelsträngiger RNA bilden können. Im Prinzip lassen sich solche Daten durch Aufgliederung der kalorimetrischen Umwandlungskurven in die den einzelnen Strukturelementen der tRNA entsprechenden Anteile erhalten (Hinz et al. 1977, Privalov und Filimonov 1978), jedoch sind diese Zuordnungen nicht ganz willkürfrei durchführbar. Um exakte Zuordnungen machen zu können, sind neben kalorimetrischen Untersuchungen an möglichst vielen sich in ihrer Struktur unterscheidenden tRNAs noch zusätzliche Informationen anderer Untersuchungsmethoden wie z.B. IR oder NMR notwendig.

Abschließend kann festgestellt werden, daß kleine Unterschiede der Sekundärstruktur bei den verschiedenen tRNAs eine starke Veränderung der Stabilität in den einzelnen tRNA-Bereichen bewirken, wie aus den unterschiedlichen Umwandlungskurven zu entnehmen ist. Es besteht für tRNAs eine Abhängigkeit der Umwandlungsenthalpien von der Anzahl der in der Sekundärstruktur vorhandenen H-Brücken. Die untersuchten tRNAs mit 50 - 63 H-Brücken in der Sekundärstruktur, weisen Umwandlungsenthalpien von 1150 - 1630 kJ/mol auf. Für tRNA^{Tyr} mit einem hohen Gehalt an GC-Basenpaaren korreliert der große Wert für die Umwandlungsenthalpie mit der hohen Umwandlungstemperatur.

Da aus der Röntgenstrukturanalyse bis jetzt außer für tRNA^{Phe} keine andere tRNA-Struktur bekannt ist, ist es z.Zt. noch nicht möglich, das unterschiedliche Umwandlungsverhalten der tRNAs hinsichtlich eventueller Unterschiede in den Ergebnissen der Kristallstrukturanalyse zu diskutieren und zuzuordnen.

Unter Beachtung der den Aussagemöglichkeiten der Methode gesetzten Grenzen ergeben sich aus den jetzt vorliegenden kalorimetrischen Untersuchungen an tRNAs neue thermodynamische Inkrement-Parameter. Weitere thermodynamische Daten, vor allem die indirekt aus den optischen Untersuchungen gewonnenen, können hiermit wesentlich verfeinert werden.

Aus der Differenz der aus Inkrementen berechneten Stabilisierungsenthalpien für die Sekundärstruktur und den tatsächlich gemessenen Umwandlungsenthalpien läßt sich ein Wert von durchschnittlich 350 kJ/mol abschätzen, das entspricht einem Viertel des Durchschnittswertes der Gesamtumwandlungsenthalpie. Der aus den kalorimetrischen Untersuchungen gewonnene Wert der Stabilisierungsenthalpie für eine Tertiärstruktur ist eine wichtige Zusatzinformation zu den Daten aus der Röntgenstrukturanalyse, die diese thermodynamischen Daten nicht liefern kann. Der Wert der Stabilisierungsenthalpie einer Tertiärstruktur ist von großer Bedeutung auch für die Diskussion

der Struktur von größeren RNA-Molekülen. So ergibt sich mit der aus den erhaltenen thermodynamischen Daten gewonnenen Information nicht nur ein Beitrag für die Strukturaufklärung der tRNA, sondern z.B. auch für 5S RNA und Viroide, zu deren Strukturaufklärung noch sehr viel Arbeit unter Anwendung von physikalisch-chemischen Methoden zu leisten sein wird.

4. Zusammenfassung

- 1.) Im präparativen Teil der Arbeit wurde durch Modifikation der in der Literatur bekannten Reinigungsverfahren zur Anreicherung von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen ein Reinigungsgang für Aminoacyl-tRNA^{Lys}-, Aminoacyl-tRNA^{Phe}- und Aminoacyl-tRNA^{Val}-Synthetasen ausgearbeitet. Dabei wurden die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen nach dem Zellaufschluß gemeinsam über drei Stufen angereichert. Nach dem dritten Reinigungsschritt konnten die drei Aminoacyl-tRNA-Synthetasen frei von störenden Aktivitäten der Nukleasen erhalten werden, so daß sie für die analytischen Beladungstests und präparative Beladung bei der Isolierung von tRNAs nach der Modifikationsmethode verwendet werden konnten.
- 2.) Nukleotidyltransferase, die in großen Mengen (vergl. 3.2.3.1.) zur enzymatischen Reparatur der 3'terminalen Gruppierung der tRNAs benötigt wurde, konnte aus 15 kg Bäckerhefe in einem vierstufigen Reinigungsgang frei von störenden Aktivitäten der Nukleasen angereichert werden.
- 3.) Für die Isolierung von tRNA^{Lys}₁, tRNA^{Lys}₂ und tRNA^{Val}₁ (jeweils aus Hefe) wurde ein Reinigungsgang ausgearbeitet. Für kalorimetrische Messungen konnten tRNA^{Lys}₁, tRNA^{Lys}₂ und tRNA^{Val}₁ unter Ausnutzung ihrer Biospezifität in einem sehr schnell durchführbaren zweistufigen bzw. dreistufigen Reinigungsgang isoliert werden.
- 4.) Die für die kalorimetrischen Messungen benötigte reine tRNA^{Phe} wurde nach einem aus der Literatur bekannten Reinigungsverfahren über BD-Cellulose isoliert.
- 5.) Zur Bestimmung der Umwandlungsenthalpien von tRNAs wurden kalorimetrische Untersuchungen an tRNA^{Lys}₁, tRNA^{Lys}₂, tRNA^{Phe}, tRNA^{Val}₁ (jeweils aus Hefe), tRNA^{Val}₁ und tRNA^{Tyr} (jeweils aus E.coli) ausgeführt. Dabei

wurden für die verschiedenen tRNAs große Unterschiede der charakteristischen Umwandlungskurven (vergl. 3.6.) festgestellt.

- 6.) Aus den kalorimetrischen Messungen ergaben sich folgende Umwandlungsenthalpien:

tRNA₁^{Val} (Hefe) 1350 $\pm$ 100 kJ/mol

tRNA₂^{Lys} (Hefe) 1150 $\pm$ 100 kJ/mol

tRNA^{Phe} (Hefe) 1250 $\pm$ 100 kJ/mol

tRNA₁^{Val} (E.coli) 1490 $\pm$ 100 kJ/mol

tRNA^{Tyr} (E.coli) 1630 $\pm$ 100 kJ/mol

- 7.) Es wurde ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der H-Brücken in der Sekundärstruktur und den Umwandlungsenthalpien der verschiedenen tRNAs festgestellt.
- 8.) Der für tRNA^{Phe} gemessene Umwandlungsenthalpie-Wert ist etwas größer als die aus der Literatur bekannten Werte (Bode et al. 1974, Freire und Biltonen 1978), stimmt aber mit dem von Hinz (Hinz et al. 1977) gemessenen Wert überein.
- 9.) Der über eine Phosphatanalyse bestimmte Extinktionskoeffizient bei 260 nm für tRNA₁^{Val} aus Hefe und die an tRNA₁^{Val} ausgeführten kalorimetrischen Untersuchungen weisen daraufhin, daß die von Privalov (Privalov et al. 1975) bestimmte Umwandlungsenthalpie für tRNA₁^{Val} wegen eines systematischen Fehlers in der Konzentrationsbestimmung zu groß ist.
- 10.) Aus der Differenz der aus den Inkrementen abgeschätzten Stabilisierungsenthalpie für die Sekundärstruktur und der gemessenen Umwandlungsenthalpie resultiert ein Wert von durchschnittlich 350 kJ/mol, der den Wechselwirkungsenergien einer Tertiärstruktur zugeordnet wurde.

- 11.) Der aus den kalorimetrischen Untersuchungen gewonnene Wert der Stabilisierungsenthalpie für eine Tertiärstruktur ist eine wichtige Zusatzinformation zu den Daten aus der Röntgenstrukturanalyse, die diese thermodynamischen Daten nicht liefern kann. Der Wert der Stabilisierungsenthalpie einer Tertiärstruktur ist von großer Bedeutung auch für die Diskussion der Struktur von größeren RNA-Molekülen. So ergibt sich mit der aus den erhaltenen thermodynamischen Daten gewonnenen Information nicht nur ein Beitrag für die Strukturaufklärung der tRNA, sondern z.B. auch für 5S RNA und Viroide, zu deren Strukturaufklärung noch sehr viel Arbeit unter Anwendung von physikalisch-chemischen Methoden zu leisten sein wird.

5. Literaturverzeichnis

- Ackermann, Th. & Rüterjans, H. (1964) Ber. d.
Bunsenges. 68, 850 - 856
- Ackermann, Th. (1977) Chemie in unserer Zeit 11, 97 - 107
- Baguley, B.C., Bergquist, P.L. & Ralph, R.K. (1965)
Biochim. Biophys. Acta 95, 510
- Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, T., Czok, R.,
Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E. & Pfeleiderer, G.
(1953) Z. Naturforschung 8b, 555
- Berg, P. (1958) J. Biol. Chem. 233, 601 - 607
- Bhanot, D.S., Kučan, Z., Aoygi, S., Lee, F.C. & Chambers, R.
(1974) in Methods in Enzymology XXIX S.547
- Bode, D. Dissertation, Universität Freiburg (1973)
- Bode, D., Schernau, U. & Ackermann, Th. (1974)
Biophys. Chem. 1, 214 - 221
- Bradley, D.F. & Rich, A. (1956) J. Amer. Chem. Soc. 78, 599
- Brahms, J., Mommaerts, W.H.F.M. & Sadron, Ch. (1964)
C.R. Acad. Sci. Paris 258, 2203
- Brandts, J.F., Jackson, W.M. & Yao-chung Ting, Th. (1974)
Biochem. 13, 3595 - 3600
- Brown, G.L., Brown, A.V.W. & Gordon, J. (1959)
Brookhaven Symp. Biol. 12, 47
- Chlumecka, V., Tigerstrom, M.von, D'Obrenan, P. &
Smith, C.J. (1969) J. Biol. Chem. 244, 5481 - 5488
- Clarke, L. & Carbon, J. (1974) J. Biol. Chem.
249, 6874 - 6885
- Coutts, S.M. (1971) Biochim. Biophys. Acta 232, 94
- Coutts, S.M., Riesner, D., Römer, R., Rabl, C.R. &
Maas, G. (1975) Biophys. Chem. 3, 275 - 289
- Cramer, F., Doepner, H., Haar, F.van der, Schlimme, E. &
Seidel, H. (1968) Proc. Nat. Ac. Sci. U.S. 61, 1384
- Crick, F.H. (1955) in E. Chargaff & J.N. Davidson,
The Nucleic Acids, Academic Press, New York (1960),
Bd. III S. 400

- De Moss, J.A., Genuth, S.M. & Novelli, G.D. (1956)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 42, 325 - 332
- Eigen, M. (1973) mannheimer forum S. 53, Verlag
Boehringer Mannheim
- Eigen, M. & Winkler, R. (1975) Das Spiel, Piper Verlag,
München
- Fasman, G.D., Lindblow, C. & Seaman, E. (1965)
J. Mol. Biol. 12, 630
- Filimonov, V.V. & Privalov, P.L. (1978)
J. Mol. Biol. 122, 465 - 470
- Freire, E. & Biltonen, R.L. (1978) Biopol. 17, 1257 - 1272
- Fresco, J.R., Adams, A., Ascione, R., Henley, P. &
Lindahl, T. (1966) Cold Spr. Harb. Symp. Quant.
Biol. 31, 527
- Gillam, I., Millward, S., Blew, D., Tigerstrom, M.von,
Wimmer, E. & Tener, G.M. (1967) Biochem. 6, 3043
- Gillam, I., Blew, D., Warrington, R.C., Tigerstrom, M.von
& Tener, G.M. (1968) Biochem. 7, 3459 - 3468
- Gralla, J. & Crothers, D.M. (1973) J. Mol. Biol. 73, 497
- Groot, N.de, Lapidot, Y., Panet, A. & Wolman, Y. (1966)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 17
- Hague, J.L. & Bright, H.A. (1941) J. Research Nat. Bur.
Standards 26, 405
- Hartmann, G. & Coy, U. (1961) Biochim. Biophys.
Acta 47, 612
- Hinz, H.-J., Filimonov, V.V., Privalov, P.L., Haar, F.von de
& Cramer, F. (1976) Eur. J. Biochem. 70, 25 - 31
- Hinz, H.-J., Filimonov, V.V. & Privalov, P.L. (1977)
Eur. J. Biochem. 72, 79 - 86
- Hoagland, M.B. (1955) Biochim. Biophys. Acta 16, 288 - 289
- Holbrook, S.R., Sussman, J.L., Warrant, R.W. & Kim, S.-H.
(1978) J. Mol. Biol. 123, 631 - 660
- Holley, R.W., Apgar, J., Doctor, B.P., Farrow, J.,
Marini, M.A. & Merrill, S.H. (1961) J. Biol. Chem.
236, 200
- Holley, R.W., Apgar, J., Everett, G.A., Madison, J.T.,
Marquise, S.H., Penswick, J.R. & Zamir, A. (1965)
Science 147, 1462

- Isaenko, S.N. & Aksel'rod, V.D. (1971)
Biokhimiya 36, 956 - 963
- Kelmers, A.D., Novelli, G.D. & Stulberg, M.P. (1965)
J. Biol. Chem. 240, 3979
- Kim, J.-J.P., Chukabutty, K. & Mehler, A.H. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 2698 - 2701
- Kim, S.-H., Suddath, F.L. Quigley, G.J., McPherson, A.,
Sussman, J.L., Wong, A.H.J., Seeman, N.C. &
Rich, A. (1974) Science (Wash D. C.) 185, 443 - 449
- Kim, S.-H. (1978) Adv. in Enzym. 48, 279 - 315
- Klump, H. (1972) Biopolymers 11, 2331
- Krakauer, H. & Sturtevant, J.M. (1968) Biopolymers
6, 491
- Kryukov, V.M., Isaenko, S.N., Aksel'rod, V.D. & Baev, A.A.
(1972) Molekulyarna Biologiya 6, 860 - 866
- Lagerkvist, U. & Waldenström (1967) J. Biol. Chem.
242, 3021 - 3025
- Levitt, M. (1969) Nature 224, 759
- Levy, J., Rialdi, G. & Biltonen, R. (1972) Biochem.
11, 4138
- Lövgren, T.N.E., Heinonen, J. & Loftfield, R.B. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 3854 - 3860
- Loftfield, R.B. (1972) Prog. Nucleic Acid Res. Mol.
Biol. 12, 87 - 128
- Madison, J.T., Boguslawski, S.J. & Tæstor, G.H. (1972)
Science 176, 687 - 689
- Martin, F., Uhlenbeck, O.C. & Doty, P. (1971) J. Mol.
Biol. 57, 201
- Maxwell, I.H., Wimmer, E. & Tener, G.M. (1968)
Biochem. 7, 2629
- Mehler, A.H. & Bank, A. (1963) J. Biol. Chem. 238, 2888
- Neumann, E. & Ackermann, Th. (1967) J. Phys. Chem.
71, 2377
- Neumann, E. & Ackermann, Th. (1969) J. Phys. Chem.
73, 2170
- Nishimura, S., Harda, F., Nurushima, U. & Seno, T.
(1967) Biochim. Biophys. Acta 142, 133
- Nishimura, S. & Novelli, G.D. (1963) Biochem. Biophys.
Res. Commun. 2, 161

- Pearson, R.C. & Kelmers, A.D. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 831
- Pearson, R.C., Weiss, J.F. & Kelmers, A.D. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 228, 770 - 774
- Pörschke, D. & Eigen, M. (1971) *J. Mol. Biol.* 62, 361
- Pongs, O., Reinwald, E. & Stamp, K. (1971) *FEBS Lett* 16, 275
- Privalov, P.L. (1970) *Biophysics* 15, 214
- Privalov, P.L., Filimonov, V.V., Venkstern, T.V. & Bayev, A.A. (1975) *J. Mol. Biol. (USSR)* 97, 279 - 288
- Privalov, P.L., Plotnikov, V.V. & Filimonov, V.V. (1975a) *J. Chem. Thermodynam.* 7, 41 - 47
- Privalov, P.L. & Filimonov, V.V. (1978) *J. Mol. Biol.* 122, 447 - 464
- Quigley, G.J., Wong, A.H.J., Seeman, N.C., Suddath, F.L., Rich, A., Sussman, J.L. & Kim, S.H. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 4866 - 4870
- Reid, B.R., Ribeiro, N.S., Gould, G., Robillard, G.T., Hilbers, C.W. & Shulman, R.G. (1975) *Acad. Sci. U.S.A.* 72, 2049 - 2053
- Reid, B.R. & Robillard, G.T. (1975) *Nature* 257, 287 - 291
- Reid, B.R. & Hurd, R.E. (1977) *Acc. Chem. Res.* 10, 396 - 402
- Rich, A. & Schimmel, P.R. (1977) *Acc. Chem. Res.* 10, 385 - 387
- Riesner, D., Römer, R. & Maas, G. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35, 369
- Riesner, D., Römer, R. & Maas, G. (1970) *Eur. J. Biochem.* 15, 85
- Robertus, J.P., Ladner, J.E., Finch, J.T., Rhodes, D., Brown, R.S., Clark, B.F.C. & Klug, A. (1974) *Nature* 250, 546 - 552
- Robillard, G.T., Tarr, L.E., Vosman, E. & Berendsen (1976) *Nature* 263, 363
- Robillard, G.T., Tarr, L.E., Vosman, F. & Sussman, J.C. (1977) *Biophys.Chem.* (291 - 298)

- Römer, R., Riesner, D., Maas, G., Wintermeyer, W.,
Thiele, R. & Zachau, H.G. (1969) FEBS Lett.
5, 15 - 19
- Römer, R., Riesner, D. & Maas, G. (1970) FEBS Lett.
10, 352 - 357
- Schmidt, J., Buchardt, B. & Reid, B.R. (1970)
J. Biol. Chem. 245, 5743
- Schmidt, J. & Reid, B.R. (1971) Analyt. Biochem.
39, 162
- Schneider, D. Solfert, R. & Haar, F.van der (1972)
H. - S. Z. Physiol. Chem. 353, 1330 - 1336
- Sen, G.C. & Ghosh, H.P. (1973) Biochim. Biophys.
Acta 308, 106 - 116
- Simon, S., Littauer, U.Z. & Katchalski, E. (1964)
Biochim. Biophys. Acta 80, 169
- Sprinzl, M. & Cramer, F. (1973) Nature New Biology 245, 3
- Sprinzl, M., Scheit, K.H., Sternbach, H., Haar, F.van der
& Cramer, F. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun.
51, 881
- Steiner, R.F. & Kitzinger, C. (1962) Nature 194, 1172
- Sternbach, H., Haar, F.van der, Schlimme, E., Gaertner, E.
& Cramer, F. (1971) Eur. J. Biochem. 22, 166 - 172
- Sturtevant, J. M. (1954) J. Phys. Chem. 58, 97
- Sussman, J.L. & Kim, S.-H. (1975) Biochim. Biophys.
Res. Commun. 68, 89
- Sussman, J.L., Holbrook, S.R., Warrant, R.W., Curch, G.M.
& Kim, S.-H. (1978) J. Mol. Biol. 123, 607 - 630
- Tsuboi, M., Higuchi, S., Kyogoku, Y. & Nishmura, S.
(1969) Biochim. Biophys. Acta 195, 23
- Watson, J.D. & Crick, F.H.C. (1953) Nature 171, 737
- Wimmer, E., Maxwell, I.H. & Tener, G.M. (1968)
Biochem. 7, 2623
- Wittig, B., Reuter, S. & Gottschling, H. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 331, 221 - 230
- Wong, Y.P., Kearns, D.R., Reid, B.R. & Shulman, R.G. (1972)
J. Mol. Biol. 72, 725 - 740

- Zachau, H.G., Dütting, D., Feldmann, H., Melchers, F.
& Karau, W. (1966) Cold Spring Harbor Symp.
Quant. Biol. 31, 417
- Zachau, H.G. (1973) in Bergmeyer, H.U. Methoden der
enzymatischen Analyse 3. Auflage Verlag Chemie,
Weinheim/Bergstraße
- Zamecnik, P.C., Stephenson, M.L. & Scott, J.F. (1960)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 46, 811

Herrn Prof. Dr. Theodor Ackermann danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Besonders bedanke ich mich für das stete Interesse an der vorliegenden Arbeit und die wissenschaftliche Betreuung.

Herrn Dr. Horst Klump danke ich für die vielen hilfreichen Diskussionen.

Herrn Dozent Dr. Gerhard Kurz und Herrn Dr. Dietmar Linder danke ich für die Bereitstellung biochemischer Hilfsmittel.

Herrn Dr. Kurt Hilse danke ich für die Unterstützung beim Aufbau der RPC-Chromatographie.

Herrn Dr. Georg Kraus danke ich für die zu den kalorimetrischen Messungen benötigte reine tRNA^{Tyr}.

Herrn Dr. Hans Sternbach danke ich für die Überlassung einer Reinigungsvorschrift zur Isolierung von Nukleotidyltransferase.

Bei meinen Laborkollegen bedanke ich mich für ihr freundschaftliches Verhalten und für hilfreiche Diskussionen.

Fräulein Ruth Lehmann und Herrn Horst Geiger bin ich für die Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen dankbar.

Herrn Willi Wangler danke ich für sorgfältige und unermüdliche Hilfe bei den analytischen und präparativen Arbeiten und der Durchführung thermodynamischer Messungen.

L e b e n s l a u f

- 31.1.1950 geboren als Sohn des Ing.-Kaufmanns Franz Anton Schott (†7.11.1961) und seiner Ehefrau Anne Schott, geb. Hautli, in Tuttlingen
- 1957 - 1961 Volksschule in Zizenhausen (Kreis Stockach)
- 1961 - 1963 Progymnasium in Stockach
- 1963 - 1969 Naturwissenschaftliches Gymnasium in Tuttlingen
- 1969 Abitur in Tuttlingen
- 1969 - 1975 Studium der Chemie an der Universität Freiburg i.Br.
- 1971 Diplom-Chemiker-Vorprüfung
- 1974 Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
- 1975 Diplomarbeit im Arbeitskreis von Dozent Dr. G. Kurz am Lehrstuhl für Biochemie von Prof. Dr. K. Wallenfels im Chemischen Laboratorium der Universität Freiburg
- 1975 Staatsexamen für das Fach Chemie
- 1975 - 1979 ab November 1975 Doktorarbeit am Lehrstuhl für Physikalische-Chemie II der Universität Freiburg unter Leitung von Prof. Dr. Th. Ackermann
- 11.1975-1.1976 Wissenschaftliche Hilfskraft
- ab 2. 1976 Wissenschaftlicher Angestellter

